



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

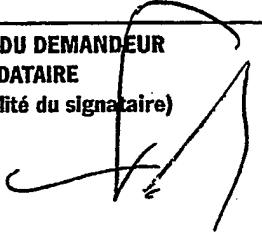
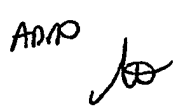
DB 540 VI / 260899

Remise des pièces DATE 11.05.00 LIEU 45 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0006030 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 11 MAI 2000 Vos références pour ce dossier (facultatif) 238532 D18868 PM		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet REGIMBEAU 26, avenue Kléber 75116 PARIS FRANCE	
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° / /	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° / /	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° / /	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) POLYPEPTIDE RH116 ET SES FRAGMENTS ET POLYNUCLEOTIDES CODANT LESDITS POLYPEPTIDES ET APPLICATIONS THERAPEUTIQUES.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation / / N° Pays ou organisation / / N° Pays ou organisation / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		ISTAC	
Prénoms			
Forme juridique		SOCIETE ANONYME	
N° SIREN		349635243	
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	1, rue du Professeur Calmette, 59000 LILLE	
	Code postal et ville		
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			

BEST AVAILABLE COPY

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 11.05.00 LIEU 75 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0006030		Réservé à l'INPI	DB 540 W /260899
Vos références pour ce dossier : (facultatif)		238532 D18868 PM	
6 MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	26, avenue Kléber	
	Code postal et ville	75116 PARIS	
N° de téléphone (facultatif)		01 45 00 92 02	
N° de télécopie (facultatif)		01 45 00 46 12	
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr	
7 INVENTEUR (S)			
Les Inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Sulte», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	
 92.1001		ADP 	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 3.../3.

REMISE DES PIÈCES DATE 11-05-00 LIEU N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI 0006030		Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire		08 629 11 360539	
Vos références pour ce dossier (facultatif)				238532 D18868 PM			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE				Pays ou organisation			
				Date / / N°			
				Pays ou organisation			
				Date / / N°			
5 DEMANDEUR				Pays ou organisation			
				Date / / N°			
				Pays ou organisation			
				Date / / N°			
Nom ou dénomination sociale				INSTITUT PASTEUR DE LILLE			
Prénoms							
Forme juridique							
N° SIREN							
Code APE-NAF							
Adresse		Rue		1, rue du Professeur Calmette, 59000 LILLE - FRANCE			
		Code postal et ville					
Pays				FRANCE			
Nationalité				Française			
N° de téléphone (facultatif)							
N° de télécopie (facultatif)							
Adresse électronique (facultatif)							
5 DEMANDEUR							
Nom ou dénomination sociale							
Prénoms							
Forme juridique							
N° SIREN							
Code APE-NAF							
Adresse		Rue					
		Code postal et ville					
Pays							
Nationalité							
N° de téléphone (facultatif)							
N° de télécopie (facultatif)							
Adresse électronique (facultatif)							
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)				VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI			
[Signature] 92-1001				[Signature]			



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerj
N° 11235

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1 / 1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif) 238532 D18868 PM			
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0006030	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) POLYPEPTIDE RH116 ET SES FRAGMENTS ET POLYNUCLEOTIDES CODANT LESDITS POLYPEPTIDES ET APPLICATIONS THERAPEUTIQUES.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : ISTAC : 1, rue du Professeur Calmette, 59000 LILLE - FRANCE INSTITUT PASTEUR DE LILLE 1, rue du Professeur Calmette, 59000 LILLE - FRANCE FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		BAHR Georges	
Prénoms			
Adresse	Rue	266, rue Nationale	59800 LILLE FR
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		COCUDE Cécile	
Prénoms			
Adresse	Rue	2, rue Charles Gounod	59112 ANNOEULLIN FR
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CAPRON André	
Prénoms			
Adresse	Rue	8, rue du Capitaine Jasmin	53133 PHALEMPIN FR
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p5 Séquences				22/5/2000	J P M - 30 AOUT 2003
planch 3/5				u	u
p 52,53,55,56			α	16.11.00	21 NOV. 2000 - V D
p.57,58			α	28.11.00	01 DEC 2000 - V D

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

ORIGINAL

1

La présente invention concerne un nouveau polypeptide de 116 kDa présentant des homologues de séquences avec des hélicases à ARN (DEXH box) dénommé RH116 et ses fragments, le clonage de l'ADNc et les polynucléotides codant lesdits polypeptides, des vecteurs de
5 clonage et/ou d'expression incluant lesdits polynucléotides, des cellules transformées par lesdits vecteurs et des anticorps spécifiques dirigés contre lesdits polypeptides. L'invention concerne également des procédés de détection et/ou de dosage desdits polypeptides et polynucléotides, les trousse de diagnostic
10 correspondantes, et un procédé de criblage de ligands, ainsi que des composés utilisables à titre de médicament pour la prévention et/ou le traitement thérapeutique.

Les muramylpeptides sont, parmi les immunomodulateurs de synthèse, ceux qui ont montré un grand nombre d'effets
15 immunopharmacologiques sur les cellules de la lignée monocyttaire /macrophagique potentialisant leur résistance non spécifique à l'infection, augmentant l'activité tumoricidale des macrophages, et aussi agissant comme adjuvants de vaccins. Le Murabutide (MB), analogue du muramylpeptide (MDP) a été sélectionné pour son
20 profil biologique particulièrement prometteur et sa bonne tolérance chez l'animal et chez l'homme. En effet, contrairement au MDP et à de nombreux autres analogues, il est démontré que le MB n'est pas pyrogène, n'induit pas de réactions inflammatoires et n'a pas montré de toxicité sévère lors des études cliniques chez des volontaires sains
25 et de patients atteints de cancer.

De part ses capacités biologiques, le MB est un agent antiviral prometteur dans le domaine du SIDA (Syndrome d'Immunodéficience acquise). En effet, le MB inhibe la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans les macrophages et
30 les cellules dendritiques mais également dans les cellules mononuclées du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) de patients infectés. Ainsi, compte tenu de ces

caractéristiques biologiques l'immunomodulateur MB a fait l'objet d'un brevet français délivré N° FR 2 724 845 et intitulé « Compositions de Muramyl peptides capables d'inhiber jusqu'à 100% la réplication d'un virus de l'immunodéficience
5 acquise tel que le VIH ». De plus, les essais cliniques de phase I et de phase IIa menés à terme sur des patients VIH+ ont démontré une bonne tolérance clinique du MB.

Les inventeurs ont démontré que le MB exerce une forte inhibition de la réplication virale dans les PBMCs de patients
10 déplétées en lymphocytes CD8, activées par la phytohémagglutinine (PHA) et mises en culture avec de l'interleukine 2 (IL-2). En effet, le MB inhibe de 70 à 100% le taux de protéine virale p24 du VIH dans les surnageants de culture. Cet effet est corrélé au taux d'expression des ARN messagers viraux (non épissés et simple épissés). De plus,
15 l'analyse du profil de cytokines et chimiokines sécrétées a démontré que le MB induisait la production de chimiokines connues comme inhibitrices de la réplication du VIH. Toutefois, cette induction ne semble pas être corrélée en totalité avec l'effet inhibiteur du MB. L'inhibition de la réplication du VIH par le MB ne passe pas
20 seulement par l'induction de la production de β -chimiokines puisque le MB intervient aussi au niveau de l'ADN proviral et de la transcription virale. L'absence de toxicité du MB dans ces mêmes cultures cellulaires a été vérifiée par les inventeurs qui ont constaté que non seulement le nombre de cellules vivantes reste inchangé en
25 début de culture mais semble, de plus, augmenter en fin de culture.

Les résultats obtenus par les inventeurs suggèrent donc que le MB induit la production de cytokines ou d'autres facteurs non identifiés à ce jour, et qui possèdent une activité suppressive de la réplication du VIH.

30 Afin d'identifier ces nouveaux facteurs impliqués dans la régulation de la réplication virale, les inventeurs ont utilisé la méthodologie du « Differential Display-RT-PCR » (DD-RT-PCR) qui

repose sur 2 étapes essentielles. Une première étape de reverse transcription (RT) de l'ARN total cellulaire afin d'obtenir des ADN complémentaires de tous les ARN qui possède une queue poly A. Ensuite, une deuxième étape d'amplification par Polymerase Chain
 5 Reaction (PCR) à partir des ADNc servant de matrice et de différents couples d'amorces en présence d'un nucléotide radio-marqué. Les produits de PCR sont ensuite séparés sur gel par électrophorèse. Les fragments différentiellement amplifiés sont coupés du gel, ré-amplifiés puis clonés et séquencés.

10 La DD-RT-PCR, réalisée à partir de PBMCs d'un patient VIH+, a permis aux inventeurs de sélectionner plus de 130 fragments d'ADNc différentiellement exprimés après traitement au MB. Ces fragments ont été sous-clonés dans le vecteur pCR2.1 (Invitrogen), puis séquencés par séquençage automatique (ABI Prism 377,
 15 Perkin-Elmer). Les séquences ont été analysées pour les recherches d'homologies en utilisant les banques de données et le serveur Basic Local Alignment Search Tool (Blast 2) du NCBI.

Les inventeurs ont identifié un nouveau polypeptide présentant des homologies de séquences avec des hélicases à ARN.

20 Les hélicases à ARN (pour revue voir Critical Rev. In Biochemistry and Molecular Biology (1998) 33 (4) : 259-296) représentent une large famille de protéines présentes dans tous les types de systèmes biologiques où l'ARN joue un rôle central. Elles sont distribuées de manière ubiquitaire dans une large gamme
 25 d'organismes et sont impliquées dans le processus d'épissage mitochondrial et nucléaire, l'édition de l'ARN (RNA editing), la maturation de rRNA (rRNA processing), l'initiation de la traduction, l'export des ARN_m nucléaires et la dégradation des ARN_m.

Les hélicases à ARN constituent des facteurs indispensables à
 30 la différenciation et au développement cellulaire, et certaines d'entre

elles jouent un rôle dans la transcription et la réplication de génome viral à ARN simple brin.

Les hélicases à ARN appartiennent au large groupe des enzymes susceptibles d'hydrolyser les nucléotides 5'-trisphosphates.

- 5 Une étude de comparaison de séquence des ATPases-ADN dépendantes a conduit à une nouvelle classification des NTPases selon le motif ATPase A. Ainsi, les hélicases à ADN se caractérisant par un motif A, encore appelé motif "Walker" (G-X-X-X-X-G-K-T), et appartiennent à la superfamille I, alors que les hélicases à ARN
10 présentent des variations dans ce domaine (A-X-X-G-X-G-K-T) et forment la superfamille II voisine (Gorbalenya *et al.*, 1988).

Des comparaisons des séquences conservées ont montré des liens étroits entre les différentes hélicases à ARN, suggérant que ces protéines dérivent d'un ancêtre commun.

- 15 En effet, l'alignement de la séquence en acides aminés de différents membres de la superfamille II des hélicases à ARN a permis de mettre en évidence une région centrale commune qui se caractérise par la présence de huit domaines hautement conservés. A l'heure actuelle, la fonction biochimique de quatre des huit
20 domaines conservés (domaines I, II, VI, et VIII) ont été élucidés. Compte tenu de la forte homologie de séquence dans le cinquième des huit éléments structuraux, appelé motif "boîte DEAD" (ou "DEAD Box") (D-E-A-D : Asp-Glu-Ala-Asp), les hélicases à ARN appartenant à la superfamille II sont également appelés protéines
25 "Boîte DEAD" (Linder *et al.*, 1989). L'existence de motifs DEAD divergents ont permis de subdiviser en sous-groupes la superfamille II des hélicases à ARN. A ce jour, trois sous-groupes ont été identifiés. Le premier sous-groupe est formé par les protéines à boîte DEAD classique, les deux autres sous-groupes sont appelés DEAH
30 et DEXH du fait de leur motif ATPase B divergent.

De part et d'autre de la séquence centrale conservée, les extrémités amino- et carboxy-terminales des hélicases à ARN se caractérisent par des séquences de longueur et de contenu variables. Il est suggéré que ces régions divergentes sont
 5 responsables des fonctions protéiques individuelles, alors que les domaines hautement conservés sont impliqués dans l'activité hélicase à ARN.

Le domaine I (A/G-X-X-G-X-G-K-T : Ala/Gly-X-X-Gly-X-Gly-lys-Thr) est décrit comme le motif A des ATPases (Walker *et al.*, 1982).

10 Le domaine V, ou boîte DEAD (L-D-E-A-D-X-X-Leu : Leu-Asp-Glu-Ala-Asp-X-X-leu représente une forme spécifique du motif ATPase B (Walker *et al.*, 1982) qui semble impliqué dans l'hydrolyse de l'ATP (Pause and Sonenbery, 1992).

Le domaine VI ou motif SAT (Ser-Ala-Thr) est localisé à
 15 proximité de la boîte DEAD et semble spécifique des hélicases à ARN.

Le domaine VIII est caractérisé par la boîte YIHRIGRXXR (Tyr-Ile-His-Arg-Ile-Gly-Arg-X-X-Arg) qui représente un motif qui est, comme SAT, spécifique aux hélicases à ARN. Des expériences *in vitro*
 20 avec le facteur d'initiation de la traduction eIF-4A indiquent que ce domaine est critique pour la liaison à l'ARN.

La présente invention a donc pour objet un polypeptide isolé dénommé « RH116 » (pour hélicase à ARN de 116 kDa) de séquence d'acides aminés SEQ ID N°2. Cette séquence comprend des domaines
 25 consensus conservés qui sont aisément identifiables par l'homme du métier et qui permettent de classer le polypeptide RH116 de l'invention dans le sous-groupe DEAH ou DEXH (pour revue voir Luking. *et al.*, (1998)) Parmi ces domaines consensus conservés, il convient de citer :

- la séquence GSGKT qui correspond aux acides aminés 332 à 336 de la séquence SEQ ID N°2, et qui constitue le domaine conservé I (G-GKT) de la superfamille des hélicases à ARN.
- la séquence DECH qui correspond aux acides aminés 443 à 446 de la séquence SEQ ID N°2 et qui constitue le domaine conservé V (DE-H) de la superfamille des hélicases à ARN du sous-groupe DEXH.

Ces deux domaines consensus conservé sont impliqués dans la fonction ATPase.

- 10 • la séquence TAS qui correspond aux acides aminés 488 à 490 de la séquence SEQ ID N°2 et qui constitue le domaine conservé VI (-A-) de la superfamille des hélicases à ARN du sous-groupe DEAH.
- la séquence RGRAR qui correspond aux acides aminés 820 à 824 de la séquence SEQ ID N°2 et qui constitue le domaine conservé VIII de la superfamille des hélicases à ARN du sous-groupe DEAH.

Ces deux domaines conservés (domaines VI et VIII) sont plus spécifiques des hélicases à ARN et sont responsables de la liaison et du déroulement de l'ARN cible.

Le polypeptide isolé se caractérise en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide de séquence SEQ ID N°2 ;
- b) un polypeptide variant de polypeptide de séquences d'acides aminés défini en a) ;
- c) un polypeptide homologue au polypeptide défini en a) ou b) et comportant au moins 80 % d'identité, de préférence 85 %, 87 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % d'identité avec ledit polypeptide de a) ;
- d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs de préférence 17, 20, 23, 25, 30, 40, 50, 100, 250 amino-acides consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ;
- e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

Dans la présente description, on utilisera le terme polypeptide pour désigner également une protéine ou un peptide.

On entendra par polypeptide variant l'ensemble des polypeptides mutés pouvant exister naturellement, en particulier
5 chez l'être humain, et qui correspondent notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions de résidus d'acides aminés.

Par polypeptide homologue, on entendra désigner les polypeptides présentant, par rapport au polypeptide naturel RH116,
10 certaines modifications comme en particulier une délétion, addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncature, un allongement et/ou une fusion chimérique. Parmi les polypeptides homologues, on préfère ceux dont la séquence d'acides aminés présente au moins 80 % d'identité, de préférence d'au moins 85 %, 87 %, 90 %, 93%, 95%, 97 %, 98 %, 99 % d'identité avec les
15 séquences d'acides aminés des polypeptides selon l'invention. Dans le cas d'une substitution, un ou plusieurs acides aminés consécutifs ou non consécutifs, peuvent être remplacés par des acides aminés « équivalents ». L'expression acide aminé « équivalent » vise ici à
20 désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans cependant modifier les caractéristiques ou propriétés fonctionnelles essentielles, comme leurs activités biologiques, des polypeptides correspondants telles que l'induction *in vivo* d'anticorps capables de reconnaître le
25 polypeptide dont la séquence d'acides aminés est comprise dans la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2, ou l'un de ses fragments. Ces acides aminés équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur les résultats des essais d'activité
30 biologique croisée auxquels les différents polypeptides sont susceptibles de donner lieu. A titre d'exemple, on mentionnera les possibilités de substitutions susceptibles d'être effectuées sans qu'il

en résulte une modification approfondie des activités biologiques des polypeptides modifiés correspondants, les remplacements, par exemple, de la leucine par la valine ou l'isoleucine, de l'acide aspartique par l'acide glutamique, de la glutamine par l'asparagine, 5 de l'arginine par la lysine etc., les substitutions inverses étant naturellement envisageables dans les mêmes conditions.

Par fragment biologiquement actif, on entendra désigner en particulier un fragment de séquence d'acides aminés de polypeptide selon l'invention présentant au moins une des caractéristiques ou 10 propriétés fonctionnelles du polypeptide selon l'invention, notamment en ce qu'il comporte une activité hélicase à ARN. Le polypeptide variant, le polypeptide homologue ou le fragment de polypeptide selon l'invention possède au moins 10 %, de préférence 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % de l'activité 15 hélicase à ARN. Différents protocoles connus de l'homme de l'art ont été décrits pour mesurer l'activité hélicase à ARN des polypeptides selon l'invention ; il convient de citer les articles de Lain *et al.* (1990) et Lee et Hurwitz (1993). Les exemples ci-après proposent des fonctions biologiques pour la protéine RH116 en fonction des 20 domaines peptidiques de cette protéine et permettent ainsi à l'homme du métier d'identifier les fragments biologiquement actifs.

Par fragment de polypeptide, on entend désigner un polypeptide comportant au minimum 15 acides aminés consécutifs, de préférence 17, 20, 23, 25, 30, 40, 50, 100, 250 amino-acides 25 consécutifs. Les fragments de polypeptide selon l'invention obtenus par clivage dudit polypeptide par une enzyme protéolytique, par un réactif chimique, ou encore en plaçant ledit polypeptide dans un environnement très acide font également partie de l'invention.

De préférence un polypeptide selon l'invention est un 30 polypeptide constitué de la séquence SEQ ID N° 2 ou d'une séquence possédant au moins 80 % d'identité, de préférence au moins 85 %, 90 %, 95 %, 98 % et 99 % d'identité avec la SEQ ID N° 2 après

alignement optimal. Par polypeptide dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 85 %, 90 %, 95 %, 98 % et 99 % après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend
 5 désigner les polypeptides présentant certaines modifications par rapport au polypeptide de référence, comme en particulier une ou plusieurs délétions, troncations, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une ou plusieurs substitutions.

Parmi les polypeptides dont la séquence d'acides aminés
 10 présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 85 %, 90 %, 95 %, 98 % et 99 % après alignement optimal avec les séquences SEQ ID N° 2 ou avec l'un de leurs fragments selon l'invention, on préfère les polypeptides variants codés par les séquences peptidiques variantes telles que
 15 précédemment définies, en particulier les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, délétion, substitution et/ou addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport aux séquences SEQ ID N°2 ou avec l'un de leurs fragments, de manière
 20 plus préférée les polypeptides variants présentant une mutation liée à une pathologie.

Le polypeptide selon l'invention se caractérise en ce qu'il est comporte au moins un domaine conservé appartenant à la superfamille des hélicases à ARN, ceux-ci étant choisi de préférence
 25 parmi les séquences G-GKT correspondant au domaine I, DEAD, DE-D, DEAH, correspondants au domaine V, SAT, -A-, correspondants au domaine VI, YIHRIGRR, HRIGR—R, -R-GR—R, ---GR, correspondants au domaine VIII.

L'invention concerne également un polynucléotide purifié ou
 30 isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide de séquence SEQ ID N°2 tel que défini précédemment. De manière préférée, le polynucléotide selon l'invention possède la séquence SEQ ID N°1.

Le polynucléotide purifié ou isolé selon l'invention se caractérise en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi :

- a) SEQ ID N° 1 ;
- b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs, de préférence d'au moins 18, 21, 24, 27, 30, 35, 40, 50, 75, 100 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 à l'exception de la séquence nucléique identifiée sous le N° d'accession AC 007750 dans la banque de données GenBank ainsi qu'à l'exception de la séquence génomique de 95417 pb identifiée sous le N° d'accession AC 0108176 dans la banque de données GenBank.
- c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 85 %, 90 %, 95 %, 98 % et 99 % après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b) ;
- d) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b) ou c).

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADN, et/ou un fragment d'ARN.

Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont été isolées et/ou purifiées, c'est-à-dire qu'elles ont

été prélevées directement ou indirectement, par exemple par copie, leur environnement ayant été au moins partiellement modifié. On entend ainsi également désigner les acides nucléiques obtenus par synthèse chimique.

- 5 Par polynucléotide de séquence complémentaire, on entend désigner tout ADN dont les nucléotides sont complémentaires de ceux de la SEQ ID N° 1 ou d'une partie de la SEQ ID N°1 et dont l'orientation est inversée.

- Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides
10 nucléiques ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties
15 au hasard et sur toute leur longueur. On entend désigner par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en
20 comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre
25 manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT,
30 BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Afin d'obtenir l'alignement optimal, on utilise de

préférence le programme BLAST, avec la matrice BLOSUM 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250.

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux
5 séquences alignées de manière optimale, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de
10 positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

15 Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 85 %, 90 %, 95 %, 98 % et 99 % après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par rapport à la séquence nucléique de référence, certaines
20 modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une substitution, notamment ponctuelle, et dont la séquence nucléique présente au moins 80 %, de préférence au moins 85 %, 90 %, 95 %, 98 % et 99 % d'identité après alignement optimal avec la séquence nucléique de
25 référence. Il s'agit de préférence de séquences dont les séquences complémentaires sont susceptibles de s'hybrider spécifiquement avec les séquences SEQ ID N° 1 de l'invention. De préférence, les conditions d'hybridation spécifiques ou de forte stringence seront telles qu'elles assurent au moins 80 %, de préférence d'au moins 85
30 %, 90 %, 95 %, 98 % et 99 % d'identité après alignement optimal entre l'une des deux séquences et la séquence complémentaire de l'autre.

Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre
5 illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon
10 phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température
15 dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100
20 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook *et al.*, 1989.

25 Parmi les séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 85 %, 90 %, 95 %, 98 % et 99 % après alignement optimal avec la séquence selon l'invention, on préfère également les séquences nucléiques variantes de SEQ ID N° 1, ou de leurs fragments, c'est-à-dire l'ensemble des
30 séquences nucléiques correspondant à des variants alléliques, c'est-à-dire des variations individuelles des séquences SEQ ID N° 1. Ces séquences mutées naturelles correspondent à des polymorphismes

présents chez les mammifères, en particulier chez l'être humain et, notamment, à des polymorphismes pouvant conduire à la survenue d'une pathologie.

On entend également désigner par séquence nucléique
5 variante tout ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou variation d'un site d'épissage de la séquence nucléique génomique dont l'ADNc a pour séquence SEQ ID N° 1.

Plus particulièrement, l'invention concerne un acide nucléique purifié ou isolé selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il
10 comprend ou est constitué de l'une des séquences SEQ ID N° 1, de leurs séquences complémentaires ou des séquences de l'ARN correspondant à SEQ ID N° 1. Les amorces ou sondes, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'un acide nucléique selon l'invention, font également partie de l'invention. Ainsi, la présente
15 invention pour la détection, l'identification, le dosage ou l'amplification de séquence d'acide nucléique concerne également les amorces ou les sondes selon l'invention qui peuvent permettre en particulier de mettre en évidence ou de discriminer les séquences nucléiques variantes, ou d'identifier la séquence génomique des
20 gènes dont l'ADNc est représenté par SEQ ID N° 1, en utilisant notamment une méthode d'amplification telle que la méthode PCR, ou une méthode apparentée. Selon l'invention, les polynucléotides pouvant être utilisés comme sonde ou comme amorce dans des procédés de détection, d'identification, de dosage ou d'amplification
25 de séquence nucléique, présentent une taille minimale de 15 bases, de préférence d'au moins 18, 20, 25, 30, 40, 50 bases.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en oeuvre notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par
30 polymérase) (Rolf *et al.*, 1991). Cette technique nécessite le choix de paires d'amorces oligonucléotidiques encadrant le fragment qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à la technique décrite

dans le brevet américain U.S. N° 4 683 202. Les fragments amplifiés peuvent être identifiés, par exemple après une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou après une technique chromatographique comme la filtration sur gel ou la chromatographie échangeuse d'ions, puis séquencés. La spécificité de l'amplification peut être contrôlée en utilisant comme amorces les séquences nucléotidiques de polynucléotides de l'invention et comme matrices, des plasmides contenant ces séquences ou encore les produits d'amplification dérivés. Les fragments nucléotidiques amplifiés peuvent être utilisés comme réactifs dans des réactions d'hybridation afin de mettre en évidence la présence, dans un échantillon biologique, d'un acide nucléique cible de séquence complémentaire à celle desdits fragments nucléotidiques amplifiés. L'invention vise également les acides nucléiques susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide d'amorces selon l'invention.

D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR (PCR-like) à l'aide de couple d'amorces de séquences nucléotidiques selon l'invention. Par PCR-like on entend désigner toutes les méthodes mettant en œuvre des reproductions directes ou indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes de marquage ont été amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues. En général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une polymérase ; lorsque l'échantillon d'origine est un ARN il convient préalablement d'effectuer une transcription reverse. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin (Walker *et al.*, 1992), la technique TAS (Transcription-based Amplification System) décrite par Kwoh *et al.* (1989), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) décrite par Guatelli *et al.* (1990), la technique NASBA

(Nucleic Acid Sequence Based Amplification) décrite par Kievitis et al. (1991), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction) décrite par Landegren et al. (1988), la technique de RCR (Repair Chain Reaction) décrite par Segev (1992), la technique CPR (Cycling Probe Reaction) décrite par Duck et al. (1990), la technique d'amplification à la Q-béta-réplique décrite par Miele et al. (1983). Certaines de ces techniques ont depuis été perfectionnées.

Dans le cas où le polynucléotide cible à détecter est un ARNm, on utilise avantageusement, préalablement à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification à l'aide des amorces selon l'invention ou à la mise en oeuvre d'un procédé de détection à l'aide des sondes de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARNm contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour les amorces ou les sondes mises en oeuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

La technique d'hybridation de sondes peut être réalisée de manières diverses (Matthews et al., 1988). La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de différents tissus ou de cellules en culture sur un support (tels que la nitrocellulose, le nylon, le polystyrène) pour réaliser par exemple des puces à ADN, puis à incuber, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Selon un autre mode de mise en oeuvre des sondes nucléiques selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées comme sondes de capture. Dans ce cas, une sonde, dite « sonde de capture », est immobilisée sur un support et sert à capturer par hybridation

spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester et l'acide nucléique cible est ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite « sonde de détection », marquée par un élément facilement détectable.

5 Parmi les fragments d'acides nucléiques intéressants, il convient par ailleurs de citer en particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut également citer les oligonucléotides sens qui, par interaction avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression. Les oligonucléotides selon l'invention présente une taille minimale de 9 bases, de préférence d'au moins 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 40, 50 bases.

15 Les sondes, amorces et oligonucléotides selon l'invention peuvent être marqués directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif, par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable. Les séquences de polynucléotides selon l'invention non marquées peuvent être utilisées directement comme sonde ou
20 amorce.

Les séquences sont généralement marquées pour obtenir des séquences utilisables pour de nombreuses applications. Le marquage des amorces ou des sondes selon l'invention est réalisé
25 par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives. Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le ^{32}P , le ^{33}P , le ^{35}S , le ^3H ou le ^{125}I . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels
30 que les agents radioluminescents, chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

La présente invention concerne également les vecteurs de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique ou codant pour un polypeptide selon l'invention. Un tel vecteur peut également contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion du polypeptide dans une cellule hôte. Une telle cellule hôte est également un objet de l'invention.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un vecteur d'expression antisens. Un tel vecteur d'expression contient une séquence de polynucléotide selon l'invention, insérée en orientation inverse dans le vecteur d'expression. Ainsi, l'homme du métier reconnaît aisément qu'un ARNm correspondant à l'ADN dans le vecteur antisens hybride avec un ARNm correspondant à de l'ADN dans le vecteur sens. Un vecteur d'expression antisens est un vecteur qui exprime un ARN antisens d'intérêt dans une cellule hôte appropriée, soit de manière constitutive soit après induction. Le terme antisens se réfère à toute composition contenant une séquence d'acide nucléique spécifique. Les molécules antisens peuvent être produites par des méthodes telles que la synthèse ou la transcription. Lorsque de telles molécules sont introduites dans la cellule, les nucléotides complémentaires se combinent avec les séquences naturelles produites par la cellule pour former des duplexes et ainsi bloquer soit la transcription ou la traduction du polypeptide selon l'invention. Il entre également dans l'étendue de l'invention, de réaliser des molécules antisens susceptibles de s'apparier avec la molécule d'ARN qui est le substrat de l'hélicase à ARN RH116, afin d'en bloquer l'activité biologique.

Les nouveaux composés identifiés susceptibles de diminuer ou d'abolir le taux d'expression et/ou l'activité hélicase à ARN du polypeptide selon l'invention constituent des antagonistes du polypeptide selon l'invention. Le terme "antagoniste" se réfère à une molécule qui, lorsqu'elle se lie au polypeptide selon l'invention, diminue la quantité ou la durée des effets de l'activité biologique ou

immunologique du polypeptide RH116. Les antagonistes incluent les protéines, les acides nucléiques, les carbohydrates, et toutes les molécules susceptibles de diminuer les effets de RH116.

Lesdits vecteurs comportent de préférence un promoteur, des
5 signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite. Selon un mode particulier de
10 réalisation de l'invention, le promoteur peut être le promoteur naturellement présent en amont du gène codant pour le polypeptide RH116 humain de l'invention.

Les différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acide nucléique
15 selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type
20 « plasmide », « cosmide » ou « mini-chromosome » ou des systèmes de type viral, les vecteurs viraux pouvant notamment être des adénovirus (Perricaudet *et al.*, 1992), des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques (Epstein *et al.*, 1992). L'homme du métier connaît les technologies utilisables pour chacun
25 de ces systèmes.

Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus (Temin, 1986), ou les AAV (Carter, 1993).

30 Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN nu ou l'ARN nu selon la technique développée par la société VICAL, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC,

bacterial artificial chromosome), les chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules murines et de
5 manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des
10 méthodes standard, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

L'invention comprend en outre les cellules hôtes, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, transformées par les vecteurs
15 selon l'invention. Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente invention, on peut citer les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais aussi les cellules de levure (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards et Aruffo, 1993), et notamment les
20 cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) et les cellules humaines. On peut citer également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en œuvre des baculovirus (Luckow, 1993). Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des protéines de l'invention est constitué par les cellules
25 COS et les cellules Hela.

L'invention comprend également les animaux transgéniques, de préférence les mammifères, excepté l'Homme, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention. Ces animaux peuvent être utilisés en temps que modèles, pour l'étude de
30 l'étiologie de pathologie liée à une altération de l'homologue animal de la protéine RH116 naturelle humaine ou pour l'étude des effets d'une infection virale provoquée par un virus à ARN, tel le VIH, sur

l'expression de la protéine RH116 en présence ou non d'un traitement anti-viral, tel qu'un antagoniste du RH116, comme par exemple le murabutide.

Parmi les mammifères selon l'invention, on préfère des animaux tels que les rongeurs, en particulier les souris, les rats ou les lapins, exprimant un polypeptide selon l'invention.

Les animaux transgéniques selon l'invention peuvent surexprimer le gène codant pour la protéine selon l'invention, ou leur gène homologue, ou exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation. Ces animaux transgéniques, en particulier des souris, sont obtenus par exemple par transfection de copie de ce gène sous contrôle d'un promoteur fort de nature ubiquitaire, ou sélectif d'un type de tissu, ou après transcription virale.

Alternativement, les animaux transgéniques selon l'invention peuvent être rendus déficients pour le gène codant pour le polypeptide de séquence SEQ ID N° 2, ou leurs gènes homologues, par inactivation ciblée par recombinaison homologue en utilisant ou non le système LOX-P/CRE recombinaise (Rohlmann *et al.*, 1996) ou par tout autre système d'inactivation de l'expression de ce gène. Ces animaux transgéniques sont obtenus par exemple par recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

Les cellules ou mammifères transformés tels que décrits précédemment peuvent aussi être utilisés à titre de modèles afin d'étudier les interactions entre les polypeptides selon l'invention, et les composés chimiques ou protéiques, impliqués directement ou indirectement dans les activités des polypeptides selon l'invention, ceci afin d'étudier les différents mécanismes et interactions mis en jeu. Ils peuvent en particulier être utilisés pour la sélection de produits interagissant avec les polypeptides selon l'invention,

notamment la protéine de séquence SEQ ID N°2 ou leurs variants selon l'invention, à titre de cofacteur, ou d'inhibiteur, notamment compétitif, ou encore ayant une activité agoniste ou antagoniste de l'activité des polypeptides selon l'invention. De préférence, on utilise
5 lesdites cellules transformées ou animaux transgéniques à titre de modèle notamment pour la sélection de composés permettant de diminuer le taux d'expression ou l'activité hélicase à ARN du polypeptide RH116 de l'invention.

En plus de leur utilité à titre de modèle d'analyse, les cellules
10 et mammifères selon l'invention sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide selon l'invention, comme décrit ci-dessous. La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, elle-même comprise dans la présente invention, se caractérise en ce que l'on cultive les cellules
15 transformées, notamment les cellules de la présente invention, dans des conditions permettant l'expression et éventuellement la sécrétion d'un polypeptide recombinant codé par une séquence d'acide nucléique selon l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant. Les polypeptides recombinants susceptibles d'être
20 obtenus par cette méthode de production font également partie de l'invention. Ils peuvent se présenter sous forme glycosylée ou non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire de la protéine naturelle. Les séquences des polypeptides recombinants peuvent être également modifiées afin d'améliorer leur solubilité, en
25 particulier dans les solvants aqueux. De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences
30 d'acide nucléique définies ci-dessus, selon les techniques de production de polypeptides recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence d'acide nucléique utilisée est placée

sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

Un système efficace de production d'un polypeptide recombinant nécessite de disposer d'un vecteur et d'une cellule hôte
5 selon l'invention. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la répllication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique
10 transfectée.

Les procédés utilisés pour la purification d'un polypeptide recombinant sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes
15 utilisées individuellement ou en combinaison, tels que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc... . Une variante préférée consiste à produire un polypeptide recombinant fusionné à une protéine « porteuse »
20 (protéine chimère). L'avantage de ce système est qu'il permet une stabilisation et une diminution de la protéolyse du produit recombinant, une augmentation de la solubilité au cours de la renaturation *in vitro* et/ou une simplification de la purification lorsque le partenaire de fusion possède une affinité pour un ligand
25 spécifique.

Les polypeptides selon la présente invention peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique en utilisant l'une des nombreuses synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides (voir notamment
30 Stewart *et al.*, 1984) ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Les polypeptides obtenus par synthèse chimique

et pouvant comporter des acides aminés non naturels correspondants sont également compris dans l'invention.

L'invention concerne également un anticorps monoclonal ou polyclonal et ses fragments, caractérisés en ce qu'ils lient
5 sélectivement et/ou spécifiquement un polypeptide selon l'invention. Les anticorps chimériques, les anticorps humanisés et les anticorps simple chaîne font également partie de l'invention. Les fragments d'anticorps selon l'invention sont de préférence des fragments Fab, F(ab')₂ ou Fv.

10 Les polypeptides selon l'invention permettent de préparer des anticorps monoclonaux ou polyclonaux. Les anticorps monoclonaux pourront avantageusement être préparés à partir d'hybridomes selon la technique décrite par Kohler et Milstein en 1975.

Les anticorps polyclonaux pourront être préparés, par exemple
15 par immunisation d'un animal, en particulier une souris, avec un polypeptide selon l'invention associé à un adjuvant de la réponse immunitaire, puis purification des anticorps spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été fixé le polypeptide ayant servi
20 d'antigène. Les anticorps polyclonaux selon l'invention peuvent aussi être préparés par purification sur une colonne d'affinité, sur laquelle a préalablement été immobilisé un polypeptide selon l'invention.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention,
25 l'anticorps est capable d'inhiber l'interaction entre le polypeptide RH116 et la séquence d'ARN sur laquelle celle-ci se lie afin d'altérer la fonction physiologique dudit polypeptide RH116.

L'invention concerne également des méthodes pour la détection
et/ou la purification d'un polypeptide selon l'invention, caractérisées
30 en ce qu'elles mettent en œuvre un anticorps selon l'invention. L'invention comprend en outre des polypeptides purifiés,

caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par une méthode selon l'invention.

Par ailleurs, outre leur utilisation pour la purification des polypeptides, les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps
5 monoclonaux, peuvent également être utilisés pour la détection de ces polypeptides dans un échantillon biologique.

Pour ces différentes utilisations, les anticorps de l'invention pourront également être marqués de la même manière que décrit précédemment pour les sondes nucléiques de l'invention et de
10 manière préférée avec un marquage de type enzymatique, fluorescent ou radioactif.

Les anticorps de l'invention constituent également un moyen d'analyse de l'expression de polypeptide selon l'invention, par exemple par immunofluorescence, marquage à l'or,
15 immunoconjugués enzymatiques. Plus généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en oeuvre dans toute situation où l'expression d'un polypeptide selon l'invention doit être observée, et plus particulièrement en immunocytochimie, en immunohistochimie ou dans des expériences de « western blotting ».

20 Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence une expression anormale de ces polypeptides dans les tissus ou prélèvements biologiques.

Plus généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en oeuvre dans toute situation où l'expression
25 d'un polypeptide selon l'invention, normal ou muté, doit être observée. Ainsi, un procédé de détection d'un polypeptide selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant les étapes de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'invention et de mise en évidence du complexe antigène-anticorps
30 formé est également un objet de l'invention.

Entre également dans le cadre de l'invention, une trousse de réactif pour la détection et/ou le dosage d'un polypeptide selon

l'invention dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants : (i) un anticorps monoclonal ou polyclonal tel que décrit précédemment ; (ii) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ; (iii) les réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique. Cette trousse est notamment utile à la réalisation d'expériences de Western Blotting ; celles-ci permettent d'étudier la régulation de l'expression du polypeptide selon l'invention à partir de
10 tissus ou de cellules. Cette trousse est également utile aux expériences d'immunoprécipitation pour mettre en évidence notamment les protéines interagissant avec le polypeptide selon l'invention. Cette trousse est également utile pour réaliser la détection et/ou le dosage d'un polypeptide selon l'invention en
15 utilisant une méthode qui met en jeu la technique ELISA, l'immunofluorescence, la radio-immunologie (technique RIA) ou une technique équivalente.

L'invention comprend également une méthode de détection et/ou de dosage d'un polynucléotide selon l'invention, dans un
20 échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes : (i) d'isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser, ou obtention d'un ADNc à partir de l'ARN de l'échantillon biologique ; (ii) d'amplification spécifique de l'ADN codant pour le polypeptide selon l'invention à l'aide d'amorces ; (iii)
25 d'analyse des produits d'amplification. C'est également un objet de l'invention de fournir une trousse pour la détection et/ou le dosage d'un acide nucléique selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :
30 (i) un couple d'amorces nucléiques selon l'invention, (ii) les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN, et éventuellement (iii) un composant permettant de vérifier la séquence

du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde selon l'invention.

L'invention comprend aussi une méthode de détection et/ou de dosage d'acide nucléique selon l'invention, dans un
5 échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes : (i) de mise en contact d'un polynucléotide selon l'invention avec un échantillon biologique ; (ii) de détection et/ou de dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique. C'est également un objet de
10 l'invention de fournir une trousse pour la détection et/ou le dosage d'acide nucléique selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants : (i) une sonde selon l'invention, (ii) les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'hybridation, et/ou le cas échéant, (iii) un
15 couple d'amorces selon l'invention, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

De préférence, l'échantillon biologique selon l'invention dans lequel sont réalisés la détection et le dosage est constitué par un fluide corporel, par exemple un sérum humain ou animal, du sang,
20 ou par des biopsies.

Font également partie de l'invention, les méthodes de détermination d'une variabilité allélique, d'une mutation, d'une délétion, d'une perte d'hétérozygotie ou de toute anomalie génétique du gène codant le polypeptide selon l'invention, caractérisées en ce
25 qu'elles mettent en oeuvre une séquence d'acide nucléique, un polypeptide ou un anticorps selon l'invention.

On peut détecter ces mutations directement par analyse de l'acide nucléique et des séquences selon l'invention (ARN, ou ADNc), mais également par l'intermédiaire des polypeptides selon
30 l'invention. En particulier, l'utilisation d'un anticorps selon l'invention qui reconnaît un épitope portant une mutation permet de

discriminer entre une protéine « saine » et une protéine « associée à une pathologie ».

Cette méthode de diagnostic et/ou d'évaluation pronostique peut être utilisée de façon préventive, ou afin de servir à
5 l'établissement et/ou la confirmation d'un état clinique chez un patient. L'analyse peut être effectuée par séquençage de tout ou d'une partie du gène (i.e. les exons), ou par d'autres méthodes connues de l'homme du métier. On peut en particulier utiliser des méthodes basées sur la PCR, par exemple la PCR-SSCP qui permet
10 de détecter des mutations ponctuelles. On peut également effectuer l'analyse par fixation d'une sonde selon l'invention sur une puce à ADN contenant au moins un polynucléotide selon l'invention et l'hybridation sur ces microplaques. Une puce à ADN contenant une séquence selon l'invention est également un des objets de
15 l'invention.

De même, une puce à protéines contenant une séquence d'acides aminés selon l'invention est aussi un objet de l'invention. Une telle puce à protéines permet l'étude des interactions entre les polypeptides selon l'invention et d'autres protéines ou des composés
20 chimiques, et peut ainsi être utile pour le criblage de composés interagissant avec les polypeptides selon l'invention. On peut également utiliser les puces à protéines selon l'invention pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre les polypeptides selon l'invention dans le sérum de patients. On peut aussi mettre en
25 œuvre une puce à protéines contenant un anticorps selon l'invention.

Des substances peuvent également être testées et identifiées pour leur aptitude à moduler les activités enzymatiques du polypeptide de l'invention. On entend désigner par "une substance
30 qui module une activité enzymatique", une substance qui change l'activité enzymatique par rapport à l'activité enzymatique mesurée en absence de la substance à tester. Par exemple une telle

substance peut inhiber partiellement ou totalement l'activité hélicase à ARN ; une telle activité peut être mesurée par des méthodes connues par l'homme de l'art. Par exemple des oligonucléotides synthétiques peuvent être immobilisés sur une
5 matrice et hybridé avec un oligoribonucléotide complémentaire marqué. Les oligoribonucléotides hybridés sont ensuite mis en œuvre avec un polypeptide de l'invention, qui relargue une certaine quantité mesurable de l'oligoribonucléotide marqué, non attaché à la matrice, compte tenu de son activité hélicase à ARN. Les effets de la
10 présence ou de l'absence de modulateurs potentiels de l'hélicase à ARN RH116 de l'invention ou l'un de ses fragments peuvent ainsi être testés. Une autre alternative consiste à utiliser le protocole décrit par Jaramillo *et al.* (1991) ; cette méthode consiste à mélanger un substrat ARN duplexe marqué au ^{32}P , avec le polypeptide de
15 l'invention dans une solution tamponnée ; la réaction est arrêtée par addition d'un mélange de glycérol/SDS/EDTA/bleu de bromophénol ; le mélange est ensuite préparé sur un gel SDS-PAGE (8%) selon les conditions standards. L'activité hélicase à ARN est estimée par le rapport entre la quantité d'ARN monomère sur la quantité d'ARN
20 duplexe. D'autres protocoles sont également disponibles (Rozen *et al.* (1990) ; Pause *et al.* (1992) ; Lain *et al.* (1993), Lee *et al.* (1993)). Ces essais peuvent être réalisés dans des microplaques afin de tester simultanément de larges quantités de modulateurs, d'inhibiteurs du polypeptide selon l'invention.

25 De telles substances peuvent être au préalable développées et sélectionnées par modelage moléculaire afin d'identifier des substances susceptibles de réagir avec un polypeptide de l'invention. Il est possible d'identifier une substance qui affecte l'aptitude de la protéine de l'invention à lier avec l'ATP ou d'autres substrats, tels
30 que l'ARN, l'ADN ou les complexes ARN/protéines. Les substrats qui interfèrent avec un site de liaison au substrat de la protéine de l'invention ou avec un site qui affecte de tels épitopes fonctionnels

peuvent être identifiés par des méthodes connues de l'homme de l'art (pour revue, voir Fruehleis *et al.*(1987) ; Perun *et al.* (1989) ; Van de Waterbeemd (1994), Blundell (1996).

L'invention concerne donc une procédé de criblage d'un
 5 composé susceptible d'affecter le taux d'expression cellulaire et/ou l'activité hélicase à ARN d'un polypeptide RH116 selon l'invention et qui comporte les étapes suivantes de (i) mise en contact d'une cellule choisie parmi la cellule hôte de l'invention et une cellule eucaryote, de préférence humaine, exprimant ou contenant le polypeptide selon
 10 l'invention, et d'un ou plusieurs composés ou ligands potentiels susceptibles de pénétrer ou d'être introduits dans ladite cellule, et de (ii) détection et/ou mesure du taux d'expression cellulaire et/ou de l'activité hélicase à ARN. Le gène codant pour le polypeptide selon l'invention qui est présent dans la cellule hôte ou dans une cellule
 15 eucaryote, de préférence humaine, correspond au moins à une séquence polynucléotidique codant pour le polypeptide de l'invention de préférence sous la forme d'ADN génomique ou d'ADNc, lié de manière opérationnelle à la séquence promotrice du gène du RH116 humaine ou du gène homologue d'une espèce animale telle la souris.
 20 Les composés criblés par un tel procédé et susceptibles d'affecter le taux d'expression de l'hélicase à ARN RH116 sont de préférence des composés susceptibles d'interagir avec les séquences polynucléotidiques régulatrices (promoteur, séquence amont, « enhancer », « silencer », « insulator », etc...) du gène codant
 25 naturellement pour le polypeptide selon l'invention ou les composés susceptibles d'interagir avec des facteurs de transcription (facteurs de transcription généraux ou facteurs tissu-spécifiques) impliqués dans la régulation de la transcription du gène codant pour le polypeptide selon l'invention, pour former un complexe susceptible
 30 d'affecter la transcription du gène codant le polypeptide RH116 de l'invention, c'est-à-dire d'augmenter, de diminuer, de moduler ou d'annuler la transcription dudit gène. Les techniques de détection

et/ou de mesure de l'activité transcriptionnelle sont connues de l'homme du métier. Il convient notamment de citer les technologies de Northern Blotting et de RT-PCR qui peuvent être mises en œuvre avec les polynucléotides de l'invention utilisés comme
 5 respectivement comme sonde ou comme amorce.

L'invention concerne également un procédé de criblage d'un composé susceptible d'affecter l'activité hélicase à ARN d'un polypeptide selon l'invention et qui comporte les étapes suivantes de
 10 (i) mise en contact dudit polypeptide et d'un ou plusieurs composé(s) ou ligands potentiel(s) en présence de réactifs nécessaires à la mise en œuvre de l'activité hélicase à ARN, et de (ii) détection et/ou mesure de l'activité hélicase à ARN.

Selon un mode préféré de réalisation, les procédés de criblage de composés précédemment décrits se caractérisent en ce que ledit
 15 composé criblé diminue ou annihile le taux d'expression et/ou l'activité hélicase à ARN du polypeptide RH116 de l'invention. Le composé susceptible d'être obtenu par les procédés précédemment décrits et qui diminue le taux d'expression et/ou l'activité hélicase à ARN du polypeptide RH116 de l'invention est un antagoniste de la
 20 RH116 et constitue également un des objets de l'invention ; ce composé se caractérise en ce qu'il est choisi parmi un polynucléotide selon l'invention utilisé en tant que séquence d'acide nucléique antisens, un vecteur d'expression antisens selon l'invention, un anticorps selon l'invention, les muramylpeptides, de préférence le
 25 Murabutide, ou parmi tout autre antagoniste du polypeptide selon l'invention.

En effet, le blocage partiel ou total de l'activité biologique du polypeptide RH116 de l'invention et de ses fragments constitue un moyen d'inhiber ou d'annihiler la réplication virale. En effet, l'ARN
 30 génomique non épissé et l'ARNm incomplètement épissé des rétrovirus tels le VIH nécessitent d'être exportés dans le cytoplasme pour l'empaquetage et/ou la traduction. Un tel processus est médié

soit par un élément de transport agissant en CIS pour les rétrovirus simples (CIS-acting constitutive transport element ou CTE), soit par la protéine virale Rev agissant en TRANS avec des éléments de réponse (Rev Responsive element pour RRE) pour les rétrovirus complexes tels le VIH. L'hélicase à ARN RH116 selon l'invention est susceptible de constituer un cofacteur pour le CTE et jouer également un rôle dans l'expression de gène médié par le RRE et ainsi de jouer un rôle dans la réplication du VIH.

La présente invention se propose donc de fournir des composés susceptibles de bloquer partiellement ou totalement l'activité hélicase à ARN du polypeptide de l'invention pour diminuer ou annihiler la réplication de virus. Parmi ceux-ci il convient de citer un polynucléotide selon l'invention utilisé en tant que séquence d'acide nucléique antisens, un vecteur d'expression antisens selon l'invention, un anticorps selon l'invention, les muramylpeptides, de préférence le Murabutide, ou tout autre antagoniste du polypeptide selon l'invention. De préférence, les muramylpeptides et le Murabutide constituent des antagonistes de la RH116 dans les cellules de patients VIH+.

La présente invention ne se limite pas au seul virus VIH mais à l'ensemble des virus faisant intervenir directement ou indirectement une hélicase à ARN dans sa réplication. Par virus, on entend désigner les virus à ADN ou à ARN, monocaténaires ou bicaténaires, enveloppés ou non-enveloppés. De préférence, les virus appartiennent à la famille des rétroviridae, des orthomyxoviridae, des rhabdoviridae, des bunyaviridae, des adénoviridae, des hépadnaviridae, des herpesviridae, des poxviridae. De préférence, les hépadnavirus sont les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C.

L'activité biologique du polypeptide de l'invention n'est pas restreinte au seul contrôle post-transcriptionnelle des ARN viraux, mais participe également au contrôle transcriptionnel des ARN en général. Ainsi, le polypeptide de l'invention constitue-t-il une cible

thérapeutique d'intérêt pour des composés susceptibles d'altérer l'activité hélicase à ARN intervenant dans d'autres processus biologiques normaux ou pathologiques.

L'hélicase à ARN constitue une cible de choix pour des composés destinés au traitement du cancer. En effet, différents articles de la littérature scientifique traitent de l'implication des hélicases à ARN dans la tumorigénèse. Ainsi une surexpression de la protéine DEAD-box1 (DDX1) est susceptible de jouer un rôle dans la progression des tumeurs telles que le neuroblastome (Nb) et le rétinoblastome (Godbout *et al.* 1998) en altérant la structure secondaire normale et le taux d'expression des ARN des cellules cancéreuses. D'autres hélicases à ARN ont été impliquées directement ou indirectement dans la tumorigénèse. Ainsi la protéine murine p68 est mutée dans les tumeurs induites par la lumière ultra-violette ; le gène de l'hélicase à ARN DDX6 est situé au niveau du point de cassure chromosomique associé avec le lymphome des cellules B. De la même manière, une protéine chimérique comprenant DDX10 et la nucléopore NUP98 semble être impliquée dans la pathogénèse de certaines maladies myéloïdes.

Les composés susceptibles de diminuer ou d'annuler l'activité hélicase à ARN de RH116 constituent donc des composés d'intérêt destinés au traitement préventif ou curatif du cancer. Parmi les cancers susceptibles d'être traités par les composés antagonistes de la RH116, il convient de citer de manière non exhaustive les cancers tels que l'adénocarcinome, la leucémie, le lymphome, le mélanome, le myélome, le sarcome, le gliome, le tératocarcinome et plus particulièrement les cancers de la glande adrénaie, de la vessie, des os, de la moelle, du sein, du tractus gastro-intestinal, du foie, du poumon, du pancréas, de l'ovaire, de l'utérus, des testicules, de la prostate et de la gorge.

De même les composés susceptibles de diminuer ou d'annuler l'activité hélicase à ARN de RH116 constituent donc des composés d'intérêt destinés au traitement préventif ou curatif d'autres pathologies telles que le rhumatisme, les maladies héréditaires, l'arthrite, l'arthérosclérose, l'ostéoporose, les maladies infectieuses aiguës et chroniques, les maladies auto-immunes, les diabètes, ainsi que les problèmes liés à la rejet des organes lors de la transplantation. Plus particulièrement, l'invention concerne les maladies immunes et auto-immunes dont fait également partie le SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise).

Les inhibiteurs, antagonistes et autres composés susceptibles de diminuer ou d'annuler l'activité hélicase à ARN de RH116 constituent des composés d'intérêt pour le traitement préventif ou curatif de maladies auto-immunes. En effet, il a été récemment rapporté par Takeda *et al.* (1999) que l'hélicase à ARN A agit comme un auto-antigène chez les patients atteints de lupus systémique érythémateux. Ainsi, le polynucléotide selon l'invention utilisé en tant que séquence d'acide nucléique antisens, le vecteur d'expression antisens selon l'invention, l'anticorps selon l'invention, les muramylpeptides, et de préférence le Murabutide, ou tout autre antagoniste du polypeptide RH116 selon l'invention, peuvent être utilisés pour le traitement des maladies auto-immunes. Parmi les maladies auto-immunes, il convient de citer plus particulièrement, l'uvéite, la maladie de Bechet, la sarcoïdose, le syndrome de Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde, la polyarthrite juvénile, le syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter, la goutte, l'ostéoarthrose, le lupus érythémateux systémique, le lupus érythémateux aigu disséminé, la polymyosite, la myocardite, la cirrhose biliaire primitive, la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse, la sclérose en plaques et autres maladies démyélinisantes, l'anémie aplasique, le purpura thrombocytopénique, le myélome multiple et le lymphome à lymphocytes B, le panhypopituitarisme de Simmonds, la maladie de

Basedow-Graves et l'ophtalmopathie de Graves, la thyroïdite subaiguë et la maladie de Hashimoto, la maladie d'Addison, le diabète sucré insulino-dépendant (type 1), la maladie d'Addison, le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte, les allergies, l'anémie,
 5 l'asthme, l'anémie hémolytique auto-immune, la bronchite, la dermatite atopique, l'emphysémie, la lymphopénie épisodique.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le procédé de criblage de composé de l'invention se caractérise en ce que ledit composé criblé augmente le taux d'expression et/ou l'activité
 10 hélicase à ARN du polypeptide RH116 de l'invention. Le composé ainsi criblé, également objet de l'invention, constitue un agoniste du polypeptide selon l'invention. Parmi les composés agonistes susceptibles d'être obtenu par le procédé de l'invention, il convient de citer les muramylpeptides, et de préférence le Murabutide ; en
 15 effet, les inventeurs ont démontré expérimentalement que ce dernier composé, le Murabutide, augmente le taux d'expression de RH116 dans les cellules de donneurs sains, se comportant ainsi comme un agoniste du polypeptide de l'invention.

20 Selon un autre mode de réalisation, l'invention porte sur un procédé de criblage de composés susceptibles d'affecter l'activité fonctionnelle d'un polypeptide selon l'invention. Un tel procédé comporte les étapes de (i) mise en contact dudit polypeptide et d'un ou plusieurs ligand(s) potentiel(s) en présence de réactifs nécessaires
 25 à la mise en œuvre d'une réaction choisie parmi la réaction d'épissage de l'ARN nucléaire et/ou mitochondrial, de réaction d'édition de l'ARN, de réaction de maturation de l'ARNr, de réaction d'initiation de la traduction, de la réaction d'export des ARNm nucléaire vers le cytoplasme, et la réaction de dégradation des ARNm
 30 et de (ii) détection et/ou mesure de ladite réaction. Le composé criblé susceptible d'être obtenu par le procédé entre également dans la portée de cette invention.

L'invention concerne donc un composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi un anticorps selon l'invention, un polypeptide selon l'invention, un polynucléotide selon l'invention, un oligonucléotide selon l'invention, un vecteur selon l'invention, un vecteur d'expression antisens selon l'invention, une cellule selon l'invention, un composé susceptible d'être obtenu par les différents procédés de criblage selon l'invention à titre de médicament et notamment en tant que principes actifs de médicament ; ces composés seront préférentiellement sous forme soluble, associés à un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Par véhicule pharmaceutiquement acceptable, on entend désigner tout type de véhicule employé habituellement dans la préparation de compositions injectables, c'est-à-dire un diluant, un agent de suspension tel une solution saline isotonique ou tamponnée. De préférence, ces composés seront administrés par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique ou par voie orale. Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés, etc.

De préférence, les composés de l'invention à titre de médicament sont destinés à la prévention et/ou au traitement de pathologies sélectionnées dans le groupe composé du cancer, des maladies infectieuses aiguës ou chroniques telles les infections par le VIH ou le virus de l'hépatite B ou C, des maladies génétiques héréditaires, des maladies immunes et auto-immunes, du rhumatisme, de l'arthrite, de l'athérosclérose, de l'ostéoporose, des diabètes et à la prévention des rejets de greffes d'organe.

Parmi les composés à titre de médicament de l'invention, les composés antagonistes du polypeptide RH116 sont particulièrement

préférée pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies virales tel que le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ou l'hépatite.

C'est également un des objets de la présente invention de
5 fournir une composition pharmaceutique pour le traitement
préventif et curatif de pathologies virales et notamment du SIDA ou
de l'hépatite caractérisée en ce qu'elle contient une quantité
thérapeutiquement efficace d'un composé antagoniste d'un
polypeptide RH116 et d'un véhicule pharmaceutiquement
10 acceptable. Plus particulièrement l'invention vise également à
fournir un produit comprenant au moins un composé antagoniste
de la RH116 et au moins un autre agent antiviral comme produit de
combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans
le temps en thérapie anti-virale, de préférence anti-VIH. Cet autre
15 agent antiviral est de préférence choisi parmi (i) les inhibiteurs
nucléotidiques ou non-nucléotidiques de la reverse transcriptase tel
que par exemple le 3'-azido-3'-déoxythymidine (AZT), le 2',3'-
didéoxyinosine (ddI), le 2',3'-didéoxycytidine (ddC), le (-)2',3'-didéoxy-
3'-théacytidine (3TC), le 2',3'-didéhydro-2',3'-didéoxythymidine (d4T),
20 le (-)2'-déoxy-5-fluoro-3'-théacytidine (FTC), le TIBO, le HEPT, le
TSAO, l' α -APA, la névirapine, le BAHP, l'acide phosphonoformique
(PFA) et (ii) les inhibiteurs de la protéase virale tels l'indinavir et le
saquinavir.

Selon un autre mode de réalisation, il est également dans
25 l'étendue de l'invention de fournir une méthode de traitement
thérapeutique ou prophylactique de maladie associée à une
augmentation de l'expression ou de l'activité du polypeptide RH116
selon l'invention. Cette méthode comprend d'administrer à un
patient qui nécessite un tel traitement, une quantité
30 thérapeutiquement efficace d'un antagoniste du polypeptide de
l'invention.

L'invention porte également sur l'utilisation d'un polypeptide selon l'invention, d'un polynucléotide selon l'invention, d'un composé agoniste d'un polypeptide RH116 selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement prophylactique de pathologies. En effet, les vaccins en général induisent une immunité à une infection ou à une maladie en générant une réponse immune chez un patient contre un antigène spécifique associé avec l'infection ou avec la maladie. Cependant, dans beaucoup de cas, les antigènes purifiés sont de faibles immunogènes. Dans de tels cas, des agents immunomodulateurs tels un adjuvant ou un immunostimulant doivent être employés pour augmenter la réponse immune. Cependant, l'un des désavantages de nombreux adjuvants employés à l'heure actuelle est leur toxicité. Il existe donc un réel besoin d'identifier de nouveaux composés qui permettent d'augmenter les réponses immunes spécifiques ; c'est ce que se propose de faire la présente invention. En effet, les polypeptides et les polynucléotides de l'invention et les composés agonistes d'un polypeptide RH116 selon l'invention peuvent être utilisés pour la préparation d'un médicament destiné à provoquer ou à augmenter la réponse immune à un vaccin chez un patient.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples représentés ci-après. Dans ces exemples on se référera aux figures suivantes.

Figure 1 : Stratégie utilisée pour l'obtention de l'extrémité 3' de l'ADNc codant pour le RH116.

Le court fragment supérieur est le fragment initial de 164 pb obtenu par le DD-RT PCR et correspond à la région 3' de l'ADNc codant pour le polypeptide RH116 de l'invention. Ce

fragment plus long de 1260 pb a été obtenu après un 3' RACE (trait inférieur).

Figure 2 : Stratégie d'obtention de la région 5' de l'ADNc codant pour le RH116.

A. La partie de l'extrémité 5' a été obtenue après deux réactions de PCR (5'RACE) pour Rapid Amplification of cDNA Ends, i.e. amplification rapide des extrémités des ADNc, les fragments obtenus sont symbolisés en (...) (R3) et en (----) (R8). Cette stratégie a donc permis aux inventeurs d'obtenir un cadre de lecture ouvert (ORF open reading frame) de 853 acides aminés. Les oligonucléotides HELI 1et HELI 2 qui serviront d'amorces pour les RT-PCR, sont indiqués.

B. La partie 5' terminale de l'ADNc correspondant au polypeptide RH116 a été obtenue après une réaction de PCR à partir de l'amorce R16 (5'RACE). Le fragment obtenu de 964pb est symbolisé en pointillé (-----)

Figure 3 : Alignement de séquence du cadre de lecture ouvert de 1025 aa (clone 10.5) (séquence supérieure) avec une hélicase à ARN humaine (RIG-1) décrite par SUN Y.W. (Numéro d'accès AF 038963) (séquence inférieure).

Les homologies de séquences sont présentées dans la ligne intermédiaire aux deux séquences. Les séquences encadrées correspondent aux domaines conservés des hélicases à ARN; les domaines G-GKT et DEXH correspondent aux domaines ATPase et les domaines SAT (-A-) et RGR-R (GR--R), spécifiques des hélicases à ARN, sont responsables de la liaison et du déroulement de l'ARN cible.

Figure 4 : Analyse par Northern Blotting de l'expression de l'ARNm du RH116

- 5 Le blot (Clontech-Multiple Tissue Northern, MTN™) contenant de l'ARN poly A⁺ est hybridé avec une sonde nucléotidique marquée en ³²P spécifique de la séquence nucléotidique de l'ARNm le RH116 puis avec une sonde spécifique de la β actine.
- 10 Différents ARNm polyA⁺ provenant de différents tissus humains ont été utilisés : (1) cerveau, (2) cœur, (3) muscle squelettique, (4) colon, (5) thymus, (6) rate, (7) rein, (8) foie, (9) petit intestin, (10) placenta, (11) poumon, (12) leucocytes
- 15 du sang périphérique

Figure 5 : Analyse par RT-PCR semi quantitative sur ARN total de PBMCs de patients VIH⁺ (P1, P2), de l'expression différentielle de l'hélicase à ARN RH116 avant (medium) et

20 **après traitement au MB (murabutide)**

La RT-PCR est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence de GAPDH (contrôle interne) et de la séquence du polypeptide RH116 à partir de 20, 100 et 500 ng d'ARN total.

EXEMPLES

Exemple 1 : Stratégie de clonage de la nouvelle séquence 5 polynucléotidique codant pour le RH116

Les expériences de Differential-Display-RT-PCR (DD-RT-PCR) ont été réalisées à partir de PBMCs d'un patient VIH+. Les inventeurs ont sélectionné plus de 130 fragments d'ADNc différenciellement
10 exprimés après traitement des PBMC de patient VIH+ au MB. Ces fragments ont été sous-clonés dans le vecteur Pcr2.1 (Invitrogen), puis séquencés par séquençage automatique (ABI Prism 377, Perkin-Elmer). Les séquences ont été analysées pour les recherches d'homologie en utilisant les banques de données et le serveur Basic
15 Local Alignment Search Tool (Blast 2) du NCBI.

A partir d'un fragment long de 164pb (SEQ ID N°3) obtenu par du DD-RT-PCR, les inventeurs ont synthétisé deux amorces spécifiques dont F1: 5' TGA TGA GGG TGG TGA TGA TGA GTA TTG TG 3' (SEQ ID N°4) afin de réaliser une première amplification par le 5' et 3'
20 RACE. Les inventeurs ont ainsi pu obtenir un fragment de 1284pb grâce à l'amplification à partir de F1. Ce fragment a été séquencé en plusieurs étapes grâce aux amorces internes spécifiques F2 (5' -GCA GTG AGT TCA AAC CCA TGA CAC AGA ATG -3') (SEQ ID N°5) et R2 : (5'- CAG CAT TCT GAA TAG TCA AGA TTG GGA AAT G -3') (SEQ ID
25 N°6) ; la séquence de ce fragment correspond à la séquence SEQ ID N°7. Celle-ci présente un cadre de lecture ouvert de 380 acides aminés jusqu'à un codon Stop potentiel lequel est suivi après 119pb par une queue poly A+ (figure N°1).

30 Afin d'obtenir la partie 5' de l'ADNc, les inventeurs ont synthétisé une amorce R3 (SEQ ID N°8) qui correspond à la séquence

complémentaire de F1 ; l'amorce R3 a permis après PCR d'obtenir une séquence de 194pb (symbolisé en pointillé dans la figure 2A).

A partir de cette séquence les inventeurs ont synthétisé une nouvelle
 5 amorce R8 (SEQ ID N°9): 5'-GTA GGG CCT CAT TGT ACT TCC TCA AAT-3') afin de déterminer la séquence en position 5' de l'ADNc : une réaction de PCR a permis d'obtenir un fragment d'environ 1200 pb (symbolisé en tiret ---- dans la figure 2a) (SEQ ID N°10). Le séquençage complet du fragment a été réalisé en plusieurs étapes
 10 grâce à des oligonucléotides internes R8-seq 1 (5 'CTC CAA CAC CAG GTG AAG CTG 3') (SEQ ID N°11) et R8-seq 2 (5' CAG ATG AAG AGA ATG TGG CAG 3') (SEQ ID N°12). Le cadre de lecture reste ouvert et permet d'identifier un cadre de lecture de 853aa.

15 A partir de ces deux séquences les inventeurs ont synthétisé deux amorces HELI 1 (5'- GGA AGT ACA ATG AGG GCC TAC AAA-3') (SEQ ID N°13) et HELI 2 (5'-TCC TCA GTC CTA GTA TAT TGC TCC-3') (SEQ ID N°14), respectivement prises sur le fragment F1 et R3, afin de réaliser des RT-PCR pour l'analyse de l'expression différentielle de
 20 l'ARNm correspondant (Voir exemple N°4)

A partir de la séquence SEQ ID N°10, les inventeurs ont synthétisé une nouvelle amorce R16 (5'-CTA AGC AGC TGA CAC TTC CTT CTG CCA AAC TTG TGT CTG -3') (SEQ ID N°15) afin de remonter en 5' de
 25 l'ADNc ; une réaction de PCR a permis d'obtenir un fragment de 964pb (symbolisé en pointillé (-.....-), figure 2b).

L'extrémité 5' de 964 pb obtenue après la réaction de PCR (5'RACE) contient un codon ATG potentiel qui est précédé d'un codon STOP
 30 dont la présence sera confirmé ultérieurement. Cette stratégie a donc permis aux inventeurs d'obtenir un cadre de lecture ouvert (ORF open reading frame) de 1025 acides aminés.

La séquence complète de l'ADNc correspondant à RH116 est maintenant de 3372pb et correspond à la SEQ ID N°1 et code pour une protéine de 1025 aa qui correspond à la SEQ ID N°2.

Une stratégie de PCR à l'aide de deux amorces F4: (5'-GGG CCC TGT
 5 GGA CAA CCT CGT CAT TGT-3') (SEQ ID N°16) et R14: (5'-CCA
 GAG TGG CTG TTT ACA TTG CCA AGG ATC ACT-3') (SEQ ID N°17)
 spécifiques de la séquence SEQ ID N°1 a été développée afin de
 confirmer la présence du codon d'initiation de la traduction ATG ainsi
 que la présence du codon STOP (TGA) en amont de celui-ci. Pour
 10 cela les inventeurs ont réalisé une PCR sur une matrice 5' RACE à
 l'aide des deux amorces citées précédemment, et ont obtenu un
 fragment de taille expectée, qui a été cloné et séquencé. La séquence
 de ce fragment a confirmé la présence du codon TGA avant le codon
 ATG initiateur confirmant ainsi que les inventeurs possèdent la
 15 copie complète de l'ADNc.

Exemple 2 : Etude de comparaison des séquences

Les inventeurs ont comparé la séquence en acides aminés déduite de
 20 1025 aa avec les séquences présentes dans les banques de données.

Les inventeurs ont identifié dans cette séquence des domaines
 conservés appartenant à la superfamille des hélicases à ARN. Cette
 séquence de 1025 aa présente le plus fort % d'homologie avec une
 25 hélicase à ARN décrite par Sun,Y.W (Genbank, numéro d'accession :
 AF038963). L'alignement des séquences est présenté en figure 3.

L'interrogation de différentes banques de données a permis aux
 inventeurs de retrouver la séquence nucléotidique dans deux clones
 30 génomiques différents. Une partie de la séquence est retrouvée dans
 le clone NH0576116 enregistré sous le numéro d'accession

gb/AC007750, tandis que la seconde partie est retrouvée dans le clone génomique RP11-214A4 enregistré sous le n°AC108176.

Exemple 3 : Etude par Northern blotting de l'expression de l'ARNm correspondant dans différents tissus.

Une séquence nucléotidique (5'-GCA TCT GCA ATG GCA AAC TTC TTG CAT GGC-3') (SEQ ID N°18) spécifique de la séquence codante a été synthétisée et marquée au ³²P (T4 Polynucléotide Kinase, Amersham) afin de servir de sonde pour réaliser un Northern blotting. L'hybridation d'une membrane contenant 2µg d'ARN poly A+ (Clontech) a révélé le résultat présenté à la figure 4. On note la faible représentativité de l'expression de l'ARNm correspondant dans les leucocytes du sang périphérique (PBMC) par rapport à d'autres tissus. La taille de l'ARNm est estimée à environ 3.5kb.

Exemple 4 : Analyse de l'expression différentielle du "RH116" dans des PBMCs de patients VIH+ et de contrôles sains.

4.1. Isolement et Traitement des PBMCs:

Des PBMC de patients (P) infectés par le VIH ou de donneurs sains contrôles (C) sont isolées, déplétées en lymphocytes CD8+ (Dynabeads, Dynal) et stimulées par la phytohémagglutinine PHA (5µg/ml) pendant 3 jours. Puis, les cellules sont traitées ou non par le Murabutide (10µg/ml) en présence d'interleukine 2 (IL2) (10U/ml) dans un milieu RPMI supplémenté par 10 % de sérum de veau foetal (SVF) pendant 6 heures ou 24 heures à raison de 5.10⁶ cellules minimum par condition.

4.2. RT-PCR :

Après traitement, l'ARN des cellules est extrait (RNAplus, Quantum-bioprobe) puis traité à la DNase (Boehringer) et

retrotranscrit (RT) à l'aide d'un oligo(dT) en présence de la reverse transcriptase Mu-MLV (Superscript II, Gibco).

La qualité des RT est vérifiée par PCR (25 cycles) à l'aide d'amorces spécifiques de la GAPDH (5'GCC ATC AAT GAC CCC TTC ATT GAC 3') (SEQ ID N°19) et (5' TGA CGA ACA TGG GGG CAT CAG CAG 3') (SEQ ID N°20) à partir de 20, 100 et 500ng d'ARN total. Puis, les inventeurs ont réalisé les RT-PCR (35cycles) à l'aide d'amorces spécifiques Héli 1 et Héli 2 du nouveau polypeptide RH116 (5' GGA AGT ACA ATG AGG GCC TAC AAA 3') (SEQ ID N°13) et 5' TCC TCA GTC CTA GTA TAT TGC TCC 3') (SEQ ID N°14). Le nombre de cycles d'amplification a été mis au point au préalable (35 cycles). Les fragments amplifiés sont visualisés sur gel d'agarose (1%) en présence de bromure d'éthidium, puis quantifiés grâce au programme Imager master (Pharmacia).

15

4.3. Evaluation de l'expression différentielle :

Pour chaque dilution, la valeur donnée pour le gène étudié est rapportée à celle de la GAPDH (Rapport=R). Pour chaque patient et chaque temps (6h ou 24h), le R des cellules traitées au Murabutide est rapporté à celui des cellules non traitées. Les résultats sont alors exprimés en % d'augmentation ou d'inhibition de l'expression du gène par rapport au cellules non traitées. Il est à noter que, pour chaque dilution testée, le R peut varier faiblement, la moyenne des R a été effectuée en prenant soin d'être toujours dans la phase linéaire d'amplification.

25

4.4. Résultats:

Les résultats comprennent une étude menée sur 12 patients et 10 contrôles sains.

L'étude sur les patients montrent une inhibition significative de l'expression du gène du RH116 après un traitement de 6 ou 24 h au Murabutide par rapport au cellules non traitées. La figure 5

30

représente les résultats de RT-PCR obtenus sur les PBMCs de deux patients après 6 heures de traitement.

D'autre part, l'étude réalisée sur des PBMCs de donneurs sains révèlent une augmentation très significative de l'expression du gène de RH116 notamment après 6 heures de traitement au Murabutide.

Exemple 5 : Expression de la protéine recombinante en système bactérien *E. coli* (pQE)

- 10 Une PCR a été réalisée sur de l'ADNc de rate à partir d'amorces nucléotidiques correspondant à l'ATG: Heli ATG: (5'- TGA GAG GAT CCG ATG TCG AAT GGG TAT TCC 3') (SEQ ID N°21) et au STOP (5'- AAT GTC GAC CTA ATC CTC ATC ACT AAA TAA -3') (SEQ ID N°22). Le fragment a été cloné dans le vecteur pQE80 (Qiagen) digéré par
- 15 les enzymes de restriction BamHI/Sal I .
- Après transformation de bactéries TOP 10F', l'expression de la protéine recombinante est induite par l'IPTG, le temps d'expression a été optimisé et estimé à deux heures, en effet après 5 heures d'induction les inventeurs ne détectent pas de protéine
- 20 recombinante. La protéine est faiblement exprimée (environ 500µg pour 500 ml de culture) et se présente sous forme soluble.

Exemple 6 : Expression de la protéine recombinante en système eucaryote

- 25 La protéine "RH116" étant exprimée dans le cytoplasme ou dans le noyau de cellules de mammifères les inventeurs ont développé une stratégie de surexpression de la protéine recombinante dans des cellules eucaryotes afin d'apprécier son rôle dans la régulation du VIH.
- 30 Pour cela la copie complète de l'ADNc a été amplifiée à partir des amorces heli-GFP-ATG (*Xho* I) (5'-TGA GAG CTC GAG ATG TCG AAT GGG TAT TCC ACA GAC -3') (SEQ ID N°23) et Heli-GFP (*Bam*

HI) (5'- TGT TTA TTT AGT GAT GAG GAT CGG GAT CCG ATT GAA-
3') (SEQ ID N°24) ; le fragment amplifié est cloné dans le vecteur
pEGFP digéré par *Xho* I/*Bam* HI puis séquencé. Le cDNA codant
pour la "Green Fluorescent Protein" (GFP) est situé en 3' de l'insert
5 cloné.

D'autre part, la copie complète de l'ADNc a été amplifiée à partir
des amorces Heli ATG Bam (5'- TGA GAG GATCCG ATG TCG AAT
GGG TAT TCC -3') (SEQ ID N°21) et Heli STOP *Xho*I (5'-TTC AAT
10 CTC GAG ATC CTC ATC ACT AAA TAA AGA -3')(SEQ ID N°25) ; le
fragment amplifié est cloné dans le vecteur pcDNA₆ digéré par *Bam*
HI /*Xho* I. Dans ce système la protéine est fusionnée à 6 Histidines
et à une protéine V5 contre laquelle des anticorps monoclonaux sont
disponibles.

15

Exemple 7 : Transfection en cellules eucaryotes

Des expériences de transfection ont été réalisées dans les
cellules cos-7 et cellules Hela à l'aide des plasmides recombinants
pEGFP et pcDNA₆ contenant la séquence complète du polypeptide
20 RH116 tels que décrits dans l'exemple 5.

Les transfections ont été réalisées (Effectene-Qiagen) avec 1µg
de plasmide recombinant et 10µl d'Effectene. Une analyse en RT-
PCR a permis de confirmer la surexpression de l'ARNm codant pour
le polypeptide RH116. L'expression des protéines recombinantes
25 fusionnées a été vérifiée par cytofluorométrie (fusion avec la GFP) ou
en western blotting (fusion avec V5-HIS₆).

REFERENCES

- Blundell (1996) *Nature* 384 : 23).
- 5 Buckholz, (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4, 538.
- Carter, (1993) *Curr. Op. Biotechnology* 3, 533.
- Duck *et al.* (1990), *Biotechniques*, 9, 142.
- 10 Edwards et Aruffo (1993), *Curr. Op. Biotechnology*, 4, 558.
- Epstein (1992) *Médecine/Sciences*, 8, 902.
- 15 Fruehleis *et al.* (1987) *Int. Ed. Engl.* 26 : 403
- Godbout *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273 : 21161
- Gorbalenya *et al.* 1988 *Nature* 333 : 22
- 20 Guatelli *et al.* (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874.
- Jaramillo *et al.* (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11 : 5992
- 25 Kievitis *et al.* (1991), *J. Virol. Methods*, 35, 273.
- Köhler et Milstein. (1975) *Nature* 256, 495.
- Kwoh, *et al.* (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1173.
- 30 Lain *et al.* (1990) *Nucleic Acid. Res.* 18 : 7003-7006

- Landegren *et al.* (1988) Science 241, 1077.
- Lee et Hurwitz (1993) Drosophila J. Biol. Chem. 268 : 16822-16830
- 5 Linder *et al.* (1989), Nature 337 : 121-122
- Luckow (1993), Curr. Op. Biotechnology 4, 564.
- Luking. *et al.* (1998) 33 : 259-296
- 10 Matthews *et al.* (1988), Anal. Biochem., 169, 1-25.
- Miele *et al.* (1983), J. Mol. Biol., 171, 281.
- 15 Neddleman et Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48 : 443
- Olins et Lee (1993), Curr. Op. Biotechnology 4 : 520.
- Pause and Sonenbery, 1992, EMBO J. 11 : 2643-2654
- 20 Pearson et Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 2444
- Perricaudet *et al.* (1992). La Recherche 23 : 471.
- 25 Perun *et al.* eds Computer-aided drug design (Marcel Dekker Inc. New York, 1989)
- Rohlmann *et al.* (1996) Nature Biotech. 14 : 1562.
- 30 Rolfs, A. *et al.* (1991), Berlin : Springer-Verlag.
- Rozen *et al.* (1990) Mol. Cell. Biol. 10 : 1134

Segev, (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.

Smith et Waterman (1981) Ad. App. Math. 2 : 482

- 5 Stewart et Yound (1984), Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford.

Takeda *et al.* (1999) J. Immunol. 163 :6269-6274

- 10 Temin, (1986) Retrovirus vectors for gene transfer. In Kucherlapati R., ed. Gene Transfer.

Van de Waterbeemd, Advanced Computer-assisted techniques in drug discovery (Verlagsgesellschaft, Weinsheim, 1994)

15

Walker *et al.* (1982), EMBO J. 1 : 945-951

REVENDICATIONS

- 5 1. Polypeptide isolé dénommé RH116 de séquence d'acides aminés
SEQ ID N°2.
2. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide
choisi parmi :
- 10 a) un polypeptide de séquence SEQ ID N°2 ;
b) un polypeptide variant de polypeptide de séquences d'acides
aminés défini en a) ;
c) un polypeptide homologue au polypeptide défini en a) ou b)
et comportant au moins 80 % d'identité avec ledit
15 polypeptide de a) ;
d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un
polypeptide défini en a), b) ou c) ;
e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en
a), b) ou c).
- 20
3. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 2
caractérisé en ce qu'il est comporte au moins un domaine conservé
appartenant à la superfamille des hélicases à ARN.
- 25 4. Polypeptide selon la revendication 3 caractérisé en ce que ledit
domaine conservé est choisi parmi :
- les séquences G-GKT correspondant au domaine I de la
superfamille des hélicases à ARN.
 - les séquences DEAD, DE-D, DEAH correspondant au domaine V
30 de la superfamille des hélicases à ARN.
5. Polynucléotide purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un
polypeptide selon la revendication 1.

6. Polynucléotide selon la revendication 5 de séquence SEQ ID N°1.
7. Polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un
5 polynucléotide choisi parmi :
- a) SEQ ID N° 1;
 - b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 à l'exception des deux séquences nucléiques enregistrées indentifiées
10 sous le numéro d'accès N°AC007750 et N°AC0108176 dans la banque de données GenBank ;
 - c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 85 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b) ;
 - 15 d) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b) ou c).
8. Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 7 en tant
20 qu'amorce pour l'amplification ou la polymérisation de séquences nucléiques.
9. Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 7 en tant
25 que sonde pour la détection de séquences nucléiques.
10. Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 7 en tant
que séquence d'acide nucléique sens ou antisens pour contrôler l'expression du produit protéique correspondant.
- 30 11. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 8, 9, 10 caractérisé en ce que ledit polynucléotide est

marqué directement ou indirectement par un composé radioactif ou un composé non radioactif.

12. Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression comprenant
5 un polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 7 ou codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
13. Vecteur recombinant d'expression antisens comprenant un
10 polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 7 caractérisé en ce que ledit polynucléotide est inséré en orientation inverse dans ledit vecteur.
14. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un
15 vecteur selon l'une des revendications 12 et 13.
15. Animal, excepté l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule selon la revendication 14.
- 20 16. Procédé de préparation d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une cellule hôte selon la revendication 14 dans des conditions permettant l'expression et éventuellement la sécrétion dudit polypeptide recombinant et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.
- 25 17. Polypeptide recombinant susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 16.
18. Anticorps monoclonal ou polyclonal et ses fragments caractérisé
30 en ce qu'il lie sélectivement un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 ou 17.

19. Procédé de détection et/ou de dosage d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 ou 17, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon la revendication 18;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

20. Trousse de réactifs pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 19 dans un échantillon biologique par réaction immunologique, caractérisé en ce qu'elle comprend les éléments suivants :

- 15 a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon la revendication 18;
- b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors la réaction immunologique.

21. Procédé de détection et/ou de dosage d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 20 a) isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser, ou obtention d'un ADNc à partir de l'ARN de l'échantillon biologique ;
- 25 b) amplification spécifique de l'ADN à l'aide d'amorces selon la revendication 8 ;
- c) analyse des produits d'amplification.

22. Procédé de détection et/ou de dosage d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 5 a) Mise en contact d'un polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 7 avec un échantillon biologique ;
b) Détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique.

23. Puce à ADN caractérisée en ce qu'elle contient un polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 7.

- 10 24. Puce à protéines caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 ou 17, ou un anticorps selon la revendication 18.

15 25. Procédé de criblage d'un composé susceptible d'affecter le taux d'expression cellulaire et/ou l'activité hélicase à ARN d'un polypeptide selon les revendications 1 à 4 ou 17 et qui comporte les étapes suivantes de:

- 20 a) mise en contact d'une cellule choisie parmi la cellule hôte de la revendication 14 et une cellule eucaryote, de préférence humaine, exprimant ou contenant le polypeptide selon la revendication 1 à 4 ou 17, et d'un ou plusieurs composés potentiels susceptibles de pénétrer ou d'être introduits dans ladite cellule;
25 b) détection et/ou mesure du taux d'expression cellulaire et/ou de l'activité hélicase à ARN.

26. Procédé de criblage d'un composé susceptible d'affecter l'activité hélicase à ARN d'un polypeptide selon les revendications 1 à 4 ou 17 et qui comporte les étapes suivantes de:

- 30 a) mise en contact dudit polypeptide et d'un ou plusieurs composé(s) potentiel(s) en présence de réactifs nécessaires à la mise en œuvre de l'activité hélicase à ARN;

b) détection et/ou mesure de l'activité hélicase à ARN.

27. Procédé selon les revendications 25 et 26 caractérisé en ce que
ledit composé criblé diminue le taux d'expression et/ou l'activité
5 hélicase à ARN du polypeptide selon les revendications 1 à 4 ou 17.

28. Composé susceptible d'être obtenu par le procédé selon la
revendication 27 caractérisé en ce qu'ils sont choisis parmi :

- 10 a) un polynucléotide selon l'une quelconque des
revendications 5 à 7 utilisé en tant que séquence d'acide
nucléique antisens selon la revendication 9 ;
- b) un vecteur d'expression antisens selon la revendication
13 ;
- c) un anticorps selon la revendication 18 ;
- 15 d) un antagoniste du polypeptide selon l'une quelconque des
revendications 1 à 4 ou 17 ;
- e) les muramylpeptides.

29. Composé selon la revendication 28 caractérisé en ce que le
20 muramylpeptide est le Murabutide.

30. Procédé selon les revendications 25 et 26 caractérisé en ce que
ledit composé criblé augmente le taux d'expression et/ou l'activité
hélicase à ARN du polypeptide selon les revendications 1 à 4 ou 17.
25

31. Composé agoniste du polypeptide selon l'une quelconque des
revendications 1 à 4 ou 17 susceptible d'être obtenu par le procédé
selon la revendication 30.

30 32. Procédé de criblage de composés susceptibles d'affecter l'activité
fonctionnelle d'un polypeptide selon les revendications 1 à 4 ou 17 et
qui comporte les étapes suivantes de:

- 5 a) mise en contact dudit polypeptide et d'un ou plusieurs composé(s) potentiel(s) en présence de réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction choisie parmi la réaction d'épissage de l'ARN nucléaire et/ou mitochondrial, de réaction d'édition de l'ARN, de réaction de maturation de l'ARNr, de réaction d'initiation de la traduction, de la réaction d'export des ARNm nucléaires vers le cytoplasme, et la réaction de dégradation des ARNm;
- 10 b) détection et/ou mesure de ladite réaction.
33. Composé susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 32.
34. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :
- 15 a) un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 ou 17;
- b) un polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 7 ;
- c) un vecteur selon la revendication 12 ou 13 ;
- d) une cellule selon la revendication 14
- e) un anticorps selon la revendication 18 ;
- 20 f) un composé selon l'une des revendications 28, 29, 31 et 33 ;
- à titre de médicament.
35. Composé selon la revendication 34 à titre de médicament destiné
- 25 à la prévention et/ou au traitement de pathologie sélectionnée dans le groupe composé du cancer, des maladies infectieuses aiguës ou chroniques, des maladies génétiques héréditaires, des maladies immunes et auto-immunes, du rhumatisme, de l'arthrite, de l'athérosclérose, de l'ostéoporose, des diabètes et à la prévention
- 30 des rejets de greffes d'organes.

36. Composé selon la revendication 35 caractérisé en ce que ladite maladie infectieuse est sélectionnée parmi le SIDA ou l'hépatite C.

37. Utilisation d'un composé selon la revendication 34 pour la
5 préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies virales.

38. Utilisation selon la revendication 37 caractérisé en ce que la
10 pathologie virale est le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

39. Composition pharmaceutique pour le traitement préventif et
curatif du SIDA caractérisée en ce qu'elle contient une quantité
thérapeutiquement efficace d'un composé selon la revendication 34
et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
15

40. Produit comprenant au moins un composé selon la revendication
34 et au moins un autre agent antiviral comme produit de
combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans
le temps en thérapie anti-virale, de préférence anti-VIH.
20

41. Utilisation selon la revendication 37 caractérisé en ce que la
pathologie virale est l'hépatite B ou C .

42. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des
25 revendications 5 à 7 et/ou d'un polypeptide selon l'une quelconque
des revendications 1 à 4 et 17 et/ou d'un agoniste d'un polypeptide
selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 17 pour la
préparation d'un médicament destiné à provoquer ou à augmenter la
réponse immune à un vaccin chez un patient.
30

6. Polynucléotide selon la revendication 5 de séquence SEQ ID N°1.
7. Polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un
5 polynucléotide choisi parmi :
- a) SEQ ID N° 1;
 - b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 à l'exception des
10 deux séquences nucléiques enregistrées indentifiées sous le numéro d'accès N°AC007750 et N°AC0108176 dans la banque de données GenBank ;
 - c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 85 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b) ;
 - 15 d) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b) ou c).
8. Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 7 en tant
20 qu'amorce pour l'amplification ou la polymérisation de séquences nucléiques.
9. Utilisation *in vitro* d'un polynucléotide selon la revendication 7 en tant que sonde pour la détection de séquences nucléiques.
25
10. Utilisation *in vitro* d'un polynucléotide selon la revendication 7 en tant que séquence d'acide nucléique sens ou antisens pour contrôler l'expression du produit protéique correspondant.
- 30 11. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 8, 9, 10 caractérisé en ce que ledit polynucléotide est

marqué directement ou indirectement par un composé radioactif ou un composé non radioactif.

12. Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression comprenant
5 un polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 7 ou codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
13. Vecteur recombinant d'expression antisens comprenant un
10 polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 7 caractérisé en ce que ledit polynucléotide est inséré en orientation inverse dans ledit vecteur.
14. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un
15 vecteur selon l'une des revendications 12 et 13.
15. Animal, excepté l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule selon la revendication 14.
- 20 16. Procédé de préparation d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une cellule hôte selon la revendication 14 dans des conditions permettant l'expression et éventuellement la sécrétion dudit polypeptide recombinant et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.
- 25 17. Polypeptide recombinant obtenu par le procédé selon la revendication 16.
18. Anticorps monoclonal ou polyclonal et ses fragments caractérisé
30 en ce qu'il lie sélectivement un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 ou 17.

- a) Mise en contact d'un polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 7 avec un échantillon biologique ;
b) Détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique.

5

23. Puce à ADN caractérisée en ce qu'elle contient un polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 7.

- 10 24. Puce à protéines caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 ou 17, ou un anticorps selon la revendication 18.

- 15 25. Procédé de criblage d'un composé qui affecte le taux d'expression cellulaire et/ou l'activité hélicase à ARN d'un polypeptide selon les revendications 1 à 4 ou 17 et qui comporte les étapes suivantes de:

- a) mise en contact d'une cellule choisie parmi la cellule hôte de la revendication 14 et une cellule eucaryote, de préférence humaine, exprimant ou contenant le polypeptide selon la revendication 1 à 4 ou 17, et d'un ou plusieurs composés potentiels susceptibles de pénétrer ou d'être introduits dans ladite cellule;
b) détection et/ou mesure du taux d'expression cellulaire et/ou de l'activité hélicase à ARN.

25

26. Procédé de criblage d'un composé qui affecte l'activité hélicase à ARN d'un polypeptide selon les revendications 1 à 4 ou 17 et qui comporte les étapes suivantes de:

- a) mise en contact dudit polypeptide et d'un ou plusieurs composé(s) potentiel(s) en présence de réactifs nécessaires à la mise en œuvre de l'activité hélicase à ARN;
b) détection et/ou mesure de l'activité hélicase à ARN.

30

27. Procédé selon les revendications 25 et 26 caractérisé en ce que ledit composé criblé diminue le taux d'expression et/ou l'activité hélicase à ARN du polypeptide selon les revendications 1 à 4 ou 17.

5

28. Composé obtenu par le procédé selon la revendication 27 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- 10 a) un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 utilisé en tant que séquence d'acide nucléique antisens selon la revendication 10 ;
- b) un vecteur d'expression antisens selon la revendication 13 ;
- c) un anticorps selon la revendication 18 ;
- 15 d) un antagoniste du polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 17 ;
- e) les muramylpeptides.

29. Composé selon la revendication 28 caractérisé en ce que le muramylpeptide est le Murabutide.

20

30. Procédé selon les revendications 25 et 26 caractérisé en ce que ledit composé criblé augmente le taux d'expression et/ou l'activité hélicase à ARN du polypeptide selon les revendications 1 à 4 ou 17.

25 31. Composé agoniste du polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 17 obtenu par le procédé selon la revendication 30.

30 32. Procédé de criblage de composés qui affectent l'activité fonctionnelle d'un polypeptide selon les revendications 1 à 4 ou 17 et qui comporte les étapes suivantes de:

- 5 a) mise en contact dudit polypeptide et d'un ou plusieurs composé(s) potentiel(s) en présence de réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction choisie parmi la réaction d'épissage de l'ARN nucléaire et/ou mitochondrial, de réaction d'édition de l'ARN, de réaction de maturation de l'ARNr, de réaction d'initiation de la traduction, de la réaction d'export des ARNm nucléaires vers le cytoplasme, et la réaction de dégradation des ARNm;
- b) détection et/ou mesure de ladite réaction.

10

33. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- 15 a) un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 ou 17;
b) un polynucléotide selon l'une des revendications 5 à 7 ;
c) un vecteur selon la revendication 12 ou 13 ;
d) une cellule selon la revendication 14
e) un anticorps selon la revendication 18 ;
f) un composé selon l'une des revendications 28, 29 et 31 ;

à titre de médicament.

- 20 34. Composé selon la revendication 33 à titre de médicament destiné à la prévention et/ou au traitement de pathologie sélectionnée dans le groupe composé du cancer, des maladies infectieuses aiguës ou chroniques, des maladies génétiques héréditaires, des maladies immunes et auto-immunes, du rhumatisme, de l'arthrite, de
- 25 l'athérosclérose, de l'ostéoporose, des diabètes et à la prévention des rejets de greffes d'organes.

35. Composé selon la revendication 34 caractérisé en ce que ladite maladie infectieuse est sélectionnée parmi le SIDA ou l'hépatite C.

30

36. Utilisation d'un composé selon la revendication 33 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies virales.
- 5 37. Utilisation selon la revendication 36 caractérisé en ce que la pathologie virale est le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).
38. Composition pharmaceutique pour le traitement préventif et curatif du SIDA caractérisée en ce qu'elle contient une quantité
10 thérapeutiquement efficace d'un composé selon la revendication 33 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
39. Produit comprenant au moins un composé selon la revendication 33 et au moins un autre agent antiviral comme produit de
15 combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en thérapie anti-virale, de préférence anti-VIH.
40. Utilisation selon la revendication 36 caractérisé en ce que la
20 pathologie virale est l'hépatite B ou C .
41. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 et/ou d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 17 et/ou d'un agoniste d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 17 pour la
25 préparation d'un médicament destiné à provoquer ou à augmenter la réponse immune à un vaccin chez un patient.

LISTE DE SEQUENCES

<110> ISTAC

<120> Polypeptide RH 116 et ses fragments et polynucléotides
codant lesdits polypeptides et applications
thérapeutiques

<130> D18868

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3372

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gggccctgtg gacaacctcg tcattgtcag gcacagagcg gtagaccctg cttctctaag 60
tgggcagcgg acagcggcac gcacatttca cctgtcccgc agacaacagc accatctgct 120
tgggagaacc ctctcccttc tctgagaaag aaagatgtcg aatgggtatt ccacagacga 180
gaatttccgc tatctcatct cgtgcttcag ggccagggtg aaaatgtaca tccagggtga 240
gcctgtgctg gactacctga cctttctgcc tgcagagggtg aaggagcaga ttcagaggac 300
agtcgccacc tccgggaaca tgcaggcagt tgaactgctg ctgagcacct tggagaaggg 360
agtcctggcac cttggttgga ctccgggaatt cgtggaggcc ctccggagaa ccggcagccc 420
tctggccgcc cgctacatga accctgagct cacggacttg ccctctccat cgtttgagaa 480
cgctcatgat gaatatctcc aactgctgaa cctccttcag cccactctgg tggacaagct 540
tctagttaga gacgtcttgg ataagtgcag ggaggaggaa ctgttgacaa ttgaagacag 600
aaaccggatt gctgctgcag aaaacaatgg aaatgaatca ggtgtaagag agctactaaa 660
aaggattgtg cagaaagaaa actgggtctc tgcatttctg aatgttcttc gtcaaacagg 720
aaacaatgaa cttgtccaag agttaacagg ctctgattgc tcagaaagca atgcagagat 780
tgagaattta tcacaagttg atggtcctca agtggaaagag caacttcttt caaccacagt 840
tcagccaaat ctggagaagg aggtctgggg catggagaat aactcatcag aatcatcttt 900
tgcagattct tctgtagttt cagaatcaga cacaagtttg gcagaaggaa gtgtcagctg 960
cttagatgaa agtcttgac ataacagcaa catgggcagt gattcaggca ccatgggaag 1020
tgattcagat gaagagaatg tggcagcaag agcatccccg gagccagaac tccagctcag 1080
gccttaccaa atggaagtgt cccagccagc cttggaaggg aagaatatca tcatctgcct 1140
ccctacaggg agtggaaaaa ccagagtggc tgtttacatt gccaaaggatc acttagacaa 1200
gaagaaaaaa gcatctgagc ctggaaaaag tatagttctt gtcaataagg tactgctagt 1260
tgaacagctc ttccgcaagg agttccaacc atttttgaag aaatggtatc gtgttattgg 1320
attaagtggg gatacccaac tgaaaaatct atttccagaa gttgtcaagt cctgtgatat 1380
tattatcagt acagctcaaa tccttgaaaa ctccctctta aacttggaag atggagaaga 1440
tgctggtgtt caattgtcag acttttctct cattatcatt gatgaatgtc atcacacca 1500
caaagaagca gtgtataata acatcatgag gcattatttg atgcagaagt tgaaaaacaa 1560
tagactcaag aaagaaaaa aaccagtgat tccccttcct cagatactgg gactaacagc 1620
ttcacctggg gttggagggg ccacgaagca agccaaagct gaagaacaca ttttaaaact 1680
atgtgccaat cttgatgcat ttactattaa aactgttaaa gaaaaccttg atcaactgaa 1740
aatcaagag aaacttctag aaataatgac aaggattcaa acttattgtc aaatgagtcc 1800
aatgtcagat tttggaactc aacctatga acaatgggcc attcaaatgg aaaaaaagc 1920
tgcaaaagaa ggaatcgca aagaaagtgt ttgtgcagaa catttgagga agtacaataa 1980
ggccctacaa ataatgaca caattcgaat gatagatgag tatactcatc ttgaaacttt 2040
ctataatgaa gagaagata agaagtttgc agtcatagaa gatgatagtg atgaggggtg 2100
tgatgatgag tattgtgatg gtgatgaaga tgaggatgat ttaaagaaac ctttgaaact 2160
ggatgaaaca gatagatttc tcatgacttt attttttgaa aacaataaaa tgttgaaaag 2220
gctggctgaa aaccagaat atgaaaatga aaagctgacc aaattaagaa ataccataat 2280
ggagcaatat actaggact aggaatcagc acgaggaata atctttacaa aaacacgaca 2340
gagtgcatat gcgctttccc agtggattac tgaaaatgaa aaatttgctg aagtaggagt 2400

```

```

caaagcccac catctgattg gagctggaca cagcagtgag ttcaaaccac tgacacagaa 2460
tgaacaaaaa gaagtcatta gttaaatttcg cactggaaaa ataatctgc ttatcgctac 2520
cacagtggca gaagaaggtc tggatattaa agaattgaac attgttatcc gttatggctc 2580
cgtcaccaat gaaatagcca tgggccaggc ccgtggtcga gccagagctg atgagagcac 2640
ctacgtcctg gttgctcaca gtggttcagg agttatcgaa cgtgagacag ttaatgattt 2700
ccgagagaag atgatgtata aagctataca ttgtgttcaa aatatgaaac cagaggagta 2760
tgctcataag attttggat tacagatgca aagtataatg gaaaagaaaa tgaaaaccaa 2820
gagaaatatt gccaaagcatt acaagaataa cccatcacta ataatcttc tttgcaaaaa 2880
ctgcagtgtg ctacgctgtt ctggggaaga tatccatgta attgagaaaa tgcacacgt 2940
caatatgacc ccagaattca aggaacttta cattgtaaga gaaaacaaag cactgcaaaa 3000
gaagtgtgcc gactatcaaa taaatggtga aatcatctgc aaatgtggcc aggcttggg 3060
aacaatgatg gtgcacaaag gcttagattt gccttgtctc aaaataagga atttttagt 3120
ggttttcaaa aataattcaa caaagaaaca atacaaaaag tgggtagaat tacctatcac 3180
atttcccaat ctgactatt cagaatgctg tttatttagt gatgaggatt agcacttgat 3240
tgaagattct tttaaaatac tatcagttaa acatttaata tgattatgat taatgtattc 3300
attatgctac agaactgaca taagaatcaa taaatgatt gttttactct ccaaaaaaaaa 3360
aaaaaaaaaa aa 3372

```

<210> 2
 <211> 1025
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Asn Gly Tyr Ser Thr Asp Glu Asn Phe Arg Tyr Leu Ile Ser
 1 5 10 15
 Cys Phe Arg Ala Arg Val Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu
 20 25 30
 Asp Tyr Leu Thr Phe Leu Pro Ala Glu Val Lys Glu Gln Ile Gln Arg
 35 40 45
 Thr Val Ala Thr Ser Gly Asn Met Gln Ala Val Glu Leu Leu Leu Ser
 50 55 60
 Thr Leu Glu Lys Gly Val Trp His Leu Gly Trp Thr Arg Glu Phe Val
 65 70 75 80
 Glu Ala Leu Arg Arg Thr Gly Ser Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Met Asn
 85 90 95
 Pro Glu Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Phe Glu Asn Ala His Asp
 100 105 110
 Glu Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys
 115 120 125
 Leu Leu Val Arg Asp Val Leu Asp Lys Cys Met Glu Glu Glu Leu Leu
 130 135 140
 Thr Ile Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ala Glu Asn Asn Gly Asn
 145 150 155 160
 Glu Ser Gly Val Arg Glu Leu Leu Lys Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn
 165 170 175
 Trp Phe Ser Ala Phe Leu Asn Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asn Glu
 180 185 190

Leu Val Gln Glu Leu Thr Gly Ser Asp Cys Ser Glu Ser Asn Ala Glu
 195 200 205
 Ile Glu Asn Leu Ser Gln Val Asp Gly Pro Gln Val Glu Glu Gln Leu
 210 215 220
 Leu Ser Thr Thr Val Gln Pro Asn Leu Glu Lys Glu Val Trp Gly Met
 225 230 235 240
 Glu Asn Asn Ser Ser Glu Ser Ser Phe Ala Asp Ser Ser Val Val Ser
 245 250 255
 Glu Ser Asp Thr Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Ser Cys Leu Asp Glu
 260 265 270
 Ser Leu Gly His Asn Ser Asn Met Gly Ser Asp Ser Gly Thr Met Gly
 275 280 285
 Ser Asp Ser Asp Glu Glu Asn Val Ala Ala Arg Ala Ser Pro Glu Pro
 290 295 300
 Glu Leu Gln Leu Arg Pro Tyr Gln Met Glu Val Ala Gln Pro Ala Leu
 305 310 315 320
 Glu Gly Lys Asn Ile Ile Ile Cys Leu Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr
 325 330 335
 Arg Val Ala Val Tyr Ile Ala Lys Asp His Leu Asp Lys Lys Lys Lys
 340 345 350
 Ala Ser Glu Pro Gly Lys Val Ile Val Leu Val Asn Lys Val Leu Leu
 355 360 365
 Val Glu Gln Leu Phe Arg Lys Glu Phe Gln Pro Phe Leu Lys Lys Trp
 370 375 380
 Tyr Arg Val Ile Gly Leu Ser Gly Asp Thr Gln Leu Lys Ile Ser Phe
 385 390 395 400
 Pro Glu Val Val Lys Ser Cys Asp Ile Ile Ile Ser Thr Ala Gln Ile
 405 410 415
 Leu Glu Asn Ser Leu Leu Asn Leu Glu Asn Gly Glu Asp Ala Gly Val
 420 425 430
 Gln Leu Ser Asp Phe Ser Phe Ile Ile Ile Asp Glu Cys His His Thr
 435 440 445
 Asn Lys Glu Ala Val Tyr Asn Asn Ile Met Arg His Tyr Leu Met Gln
 450 455 460
 Lys Leu Lys Asn Asn Arg Leu Lys Lys Glu Asn Lys Pro Val Ile Pro
 465 470 475 480
 Leu Pro Gln Ile Leu Gly Leu Thr Ala Ser Pro Gly Val Gly Gly Ala
 485 490 495
 Thr Lys Gln Ala Lys Ala Glu Glu His Ile Leu Lys Leu Cys Ala Asn
 500 505 510
 Leu Asp Ala Phe Thr Ile Lys Thr Val Lys Glu Asn Leu Asp Gln Leu

515	520	525
Lys Asn Gln Ile Gln Glu Pro Cys Lys Lys Phe Ala Ile Ala Asp Ala 530 535 540		
Thr Arg Glu Asp Pro Phe Lys Glu Lys Leu Leu Glu Ile Met Thr Arg 545 550 555 560		
Ile Gln Thr Tyr Cys Gln Met Ser Pro Met Ser Asp Phe Gly Thr Gln 565 570 575		
Pro Tyr Glu Gln Trp Ala Ile Gln Met Glu Lys Lys Ala Ala Lys Glu 580 585 590		
Gly Asn Arg Lys Glu Ser Val Cys Ala Glu His Leu Arg Lys Tyr Asn 595 600 605		
Lys Ala Leu Gln Ile Asn Asp Thr Ile Arg Met Ile Asp Ala Tyr Thr 610 615 620		
His Leu Glu Thr Phe Tyr Asn Glu Glu Lys Asp Lys Lys Phe Ala Val 625 630 635 640		
Ile Glu Asp Asp Ser Asp Glu Gly Gly Asp Asp Glu Tyr Cys Asp Gly 645 650 655		
Asp Glu Asp Glu Asp Asp Leu Lys Lys Pro Leu Lys Leu Asp Glu Thr 660 665 670		
Asp Arg Phe Leu Met Thr Leu Phe Phe Glu Asn Asn Lys Met Leu Lys 675 680 685		
Arg Leu Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Glu Asn Glu Lys Leu Thr Lys Leu 690 695 700		
Arg Asn Thr Ile Met Glu Gln Tyr Thr Arg Thr Glu Glu Ser Ala Arg 705 710 715 720		
Gly Ile Ile Phe Thr Lys Thr Arg Gln Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Gln 725 730 735		
Trp Ile Thr Glu Asn Glu Lys Phe Ala Glu Val Gly Val Lys Ala His 740 745 750		
His Leu Ile Gly Ala Gly His Ser Ser Glu Phe Lys Pro Met Thr Gln 755 760 765		
Asn Glu Gln Lys Glu Val Ile Ser Lys Phe Arg Thr Gly Lys Ile Asn 770 775 780		
Leu Leu Ile Ala Thr Thr Val Ala Glu Glu Gly Leu Asp Ile Lys Glu 785 790 795 800		
Cys Asn Ile Val Ile Arg Tyr Gly Leu Val Thr Asn Glu Ile Ala Met 805 810 815		
Val Gln Ala Arg Gly Arg Ala Arg Ala Asp Glu Ser Thr Tyr Val Leu 820 825 830		
Val Ala His Ser Gly Ser Gly Val Ile Glu Arg Glu Thr Val Asn Asp 835 840 845		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.